

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS**  
**SINTÉTICOS E BIOATIVOS**

**FRACIONAMENTO QUÍMICO BIOMONITORADO DA FRAÇÃO**  
**AQUOSA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Cissampelos***  
***sympodialis* EICHL. (MILONA).**

**AYALA NARA PEREIRA GOMES**

**JOÃO PESSOA**  
**2015**

**AYALA NARA PEREIRA GOMES**

**FRACIONAMENTO QUÍMICO BIOMONITORADO DA FRAÇÃO  
AQUOSA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Cissampelos  
sympodialis* EICHL. (MILONA).**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr.: Eduardo de Jesus Oliveira

**JOÃO PESSOA**

**2015**

G633f Gomes, Ayala Nara Pereira.

Fracionamento químico biomonitorado da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* EICHL. (Milona) / Ayala Nara Pereira Gomes.- João Pessoa, 2015.

110f. : il.

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. Menispermaceae. 3. Compostos fenólicos. 4. Atividade antioxidante. 5. Ação anti-inflamatória. 6. *Cissampelos sympodialis*.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**AYALA NARA PEREIRA GOMES**

**FRACIONAMENTO QUÍMICO BIOMONITORADO DA FRAÇÃO  
AQUOSA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Cissampelos*  
*sympodialis* EICHL. (MILONA).**

Aprovada em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (UFPB - Orientador)**

---

**Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos (UFPB – Avaliador interno)**

---

**Prof. Dr. Adley Antonini Neves de Lima (UFRN – Avaliador externo)**

*À Deus por sempre me conceder sabedoria nas escolhas  
dos melhores caminhos, coragem para acreditar,  
força para não desistir e proteção para me amparar.*

*Às pessoas que mais amo na vida: Expedito Gomes,  
Alvenir Pereira, Júlia Aparecida e Lucas Cruz  
pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional  
que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus  
desafios.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo;

Ao meu orientador professor Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, pela confiança, incentivo e dedicação, e pelo conhecimento ao longo dos anos no LAFAM;

À professora Sandra Mascarenhas e Luiz Henrique pelos ensinamentos da imunofarmacologia e o auxílio na realização deste trabalho.

À professora Tânia pelo auxílio na execução da atividade antioxidante;

Aos meus pais Expedito e Vene, que sempre me apoiaram e me deram força para enfrentar os desafios.

À minha irmã Júlia, meu porto-seguro, companheira de uma vida toda, a quem primeiro eu recorro em horas difíceis, sempre esteve ao meu lado, me incentivando e dando apoio.

Ao meu namorado Lucas por contornar minhas preocupações desnecessárias e ser tão presente em minha vida, longe ou perto.

À equipe do LAFAM, que nunca mediu esforços para me ajudar dentro e fora do laboratório, mostrando que mais do que colegas de trabalho somos amigos de verdade;

Aos amigos da turma de mestrado, Rose, Márcio, Cris, Kaio e Yngred, pelo companheirismo nas aulas e por deixa-las menos exaustivas;

À Professora Fátima Vanderlei e seus alunos, pela generosidade e disponibilidade em ajudar;

Às alunas de iniciação científica Laninha e Juliane, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos que me incentivaram a fazer o mestrado e me fizeram ver que eu estava no caminho certo;

Aos técnicos de laboratório, Gilvandro, Nonato, Alexsandro, Sócrates e Evandro, pela ajuda com a obtenção dos liofilizados, material de laboratório, desenvolvimento das análises cromatográficas e ressonância;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

*“Que a importância de uma coisa não se mede com fita métrica nem com balanças nem barômetros etc. Que a importância de uma coisa há que ser medida pelo encantamento que a coisa produza em nós.”*

*Manoel de Barros*

## RESUMO

A utilização dos produtos naturais para o tratamento das enfermidades é uma prática antiga e comum mundialmente. A espécie *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) é conhecida popularmente como milona, jarrinha, abuteira e orelha-de-onça, e sua fração aquosa do extrato etanólico das folhas (FAEEF) apresenta comprovadas ações farmacológicas. A família é caracterizada pela presença de alcaloides, e estudos com a *C. sympodialis* demonstram que além destes, há uma quantidade relevante de compostos fenólicos. Embora os estudos farmacológicos tenham sido realizados com a FAEEF os estudos químicos se concentram até o momento no extrato etanólico das folhas e raízes. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um fracionamento químico biomonitorado da FAEEF de *C. sympodialis*. Uma partição do extrato em água foi feita com o auxílio de ultrassom, para obtenção da FAEEF e esta foi submetida a uma extração em fase sólida (com cartuchos de sílica de fase reversa C-18) com eluição com MeOH:H<sub>2</sub>O em ordem decrescente de polaridade e forneceu quatro subfrações. O teor de compostos fenólicos e flavonóis totais foi determinado respectivamente pelo método de Folin–Ciocalteu e Cloreto de alumínio e a atividade antioxidante através dos métodos indiretos com os radicais DPPH e ABTS. As subfrações também foram submetidas a ensaios imunofarmacológicos, onde foi avaliada a viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos pelo método de MTT, dosagem de óxido nítrico, através da determinação indireta do nitrito e quantificação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  através de ELISA. Observou-se que as frações mais polares (eluídas com 25 % e 50% de metanol) apresentaram uma maior quantidade de compostos fenólicos (11,51  $\pm$  1,73 e 14,50  $\pm$  5,25 mg EAG/ 100 mg respectivamente) além de uma maior atividade antioxidante, chegando a fração de 25 % a uma CE<sub>50</sub> de 13,54  $\pm$  0,13  $\mu$ g/mL pelo método ABTS e 15,09  $\pm$  0,14  $\mu$ g/mL pelo método DPPH. As subfrações estudadas (3 e 50  $\mu$ g/mL) não apresentaram toxicidade às células e a fração eluída com 75% de Metanol foi a única que reduziu de forma significativa os níveis de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sendo considerada como a fração com melhor ação anti-inflamatória. O presente trabalho confirma a ação anti-inflamatória da espécie, além de demonstrar seu potencial antioxidante, e aponta para o papel de substâncias polares, possivelmente compostos fenólicos como responsáveis por estas atividades.

Palavras-chave: Menispermaceae; Compostos fenólicos; atividade antioxidante; ação anti-inflamatória; *Cissampelos sympodialis*.

## ABSTRACT

The use of natural products as a therapeutic resource is both ancient and ubiquitous. The species *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) is popularly known as milona, jarrinha, abuteira and orelha-de-onça and the aqueous fraction of the ethanol extract of its leaves (FAEEF) has shown promising pharmacological actions. The Menispermaceae family is known by the presence of alkaloids and studies with *C. sympodialis* have shown that in addition to alkaloids, there is a significant amount of phenolic compounds. Although all pharmacological studies have been conducted with the FAEEF, chemical studies have focused so far in the ethanol extract of leaves and roots. Thus, the aim of this work was to conduct a bioassay-guided fractionation of FAEEF. The aqueous fraction was prepared using ultrasound-assisted extraction and then submitted to solid phase extraction (using reverse phase C18 cartridges). The cartridges were eluted using a gradient of MeOH:H<sub>2</sub>O yielding four fractions. The content of phenolics and total flavonoids in the fractions was determined using the Folin-Ciocalteu and Aluminium chloride methods respectively. The antioxidant potential of the fractions was determined using the iDPPH and ABTS radical methods. All fractions were then submitted to immunopharmacological assays to evaluate the toxicity of the fractions to peritoneal murine macrophages (using the MTT viability assay), nitric oxide production (through nitrite quantification), and secretion of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  using ELISA. The more polar fractions (eluted with 25% and 50% MeOH) had a higher content of total phenolics ( $11.51 \pm 1.73$  and  $14.50 \pm 5.25$  mg GAE/ 100 mg respectively) and also a higher antioxidant activity with the 25% fraction showing a EC<sub>50</sub> of  $13.54 \pm 0.13$   $\mu$ g/mL using the ABTS method and  $15.09 \pm 0.14$   $\mu$ g/mL using the DPPH method. The fractions studied (at concentrations of 3 and 50  $\mu$ g/mL did not present toxicity to murine macrophages and the 75% fraction was the only one that was able to significantly reduce the levels of NO, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and thus is the fraction showing the most promising anti-inflammatory action. This study confirms the anti-inflammatory action of the species, besides demonstrating its antioxidant potential, and points to the role of polar substances, possibly as phenolic compounds responsible for these activities.

Keywords: Menispermaceae, Phenolics, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, *Cissampelos sympodialis*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa de distribuição do gênero <i>Cissampelos</i> .....	25
Figura 2: Detalhe das folhas e frutos da espécie <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	26
Figura 3: Estrutura química da warifiteína (1), metilwarifiteína (2) e milonina (3). ....	27
Figura 4: Resumo dos alvos terapêutico de <i>Cissampelos Sympodialis</i> .....	30
Figura 5: Reconhecimento do LPS pelos macrófagos.....	37
Figura 6: A: Subfrações eluídas em ordem decrescente de polaridade, com 25% ,50%, 75% e 100% de metanol da esquerda para direita. B: Fração aquosa liofilizada. ....	56
Figura 7: Perfil cromatográfico do extrato e fração aquosa de <i>C. sympodialis</i> , obtido em método gradiente de 5% a 95% de MeOH em 90 min, com fluxo de 1mL/min e $\lambda= 250$ . ....	57
Figura 8: Perfil cromatográfico das subfrações de <i>C. sympodialis</i> , obtido em método gradiente de 5% a 95% de MeOH em 90 min, com fluxo de 1mL/min e $\lambda= 250$ nm. ....	58
Figura 9: Espectro de $^1\text{H}$ RMN das subfrações de <i>C. sympodialis</i> obtido em 200 MHz. ....	59
Figura 10: Separação cromatográfica da subfração eluída com 50% de metanol obtido em método gradiente em 90 min, com fluxo de 4 mL/min e $\lambda= 250$ . ....	60
Figura 11: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Cs-1 e sua expansão .....	62
Figura 12: Expansões do espectro de $^{13}\text{C}$ .....	62
Figura 13: Cs-1: Apigenina-6-C, 8-C-di- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Vicenina-2) .....	64
Figura 14: Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico versus as absorvâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Ciocalteu. ....	67
Figura 15: Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina versus as leituras de absorvâncias (425 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio. ....	68
Figura 16: Concentração de fenólicos totais expressa em mg equivalente ácido gálico no extrato, fração aquosa e subfrações de <i>C. sympodialis</i> . ....	69
Figura 17: Concentração de flavonóis totais expressa em mg equivalente quercetina no extrato, fração aquosa e subfrações de <i>C. sympodialis</i> . ....	70
Figura 18: Correlação entre Fenólicos totais das seis amostras analisadas e a CE50. Obtida pelo método com DPPH como radical.....	73
Figura 19: CE50 expressa em $\mu\text{g/mL}$ do extrato, fração aquosa, subfrações de <i>C. sympodialis</i> e Ácido Ascórbico.....	73
Figura 20: Correlação entre Fenólicos totais das seis amostras analisadas e a CE <sub>50</sub> obtida pelo método com DPPH como radical.....	75

Figura 21: CE <sub>50</sub> expressa em µg/mL do extrato, fração aquosa, subfrações de <i>C. sympodialis</i> e Trolox.....	75
Figura 22: Correlação entre a CE <sub>50</sub> obtida pelo método com DPPH e ABTS como radical. ..	76
Figura 23: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos tratados por 24h com as subfrações (3 e 50 µg/mL) e a fração aquosa do extrato etanólico de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. ....	78
Figura 24: Efeito das subfrações (3 e 50 µg/mL) e da fração aquosa do extrato etanólico de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. sobre a produção de NO em macrófagos peritoneais murinos após estímulo com LPS (1 µg/mL) in vitro. ....	80
Figura 25: Efeito das subfrações (3 e 50 µg/mL) e da fração aquosa do extrato etanólico de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. sobre a produção de TNF-α em macrófagos peritoneais murinos após estímulo com LPS (1 µg/mL) in vitro. ....	83
Figura 26: Efeito das subfrações (3 e 50 µg/mL) e da fração aquosa do extrato etanólico de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. sobre a produção de IL-1β em macrófagos peritoneais murinos após estímulo com LPS (1 µg/mL) in vitro. ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento (massa/massa) e quantidade das amostras obtidas nos processos de maceração e extração em fase sólida.....	56
Tabela 2: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de Cs-1 (200 e 50 MHz, respectivamente), com dados da literatura. ....	65
Tabela 3: Concentração média ± coeficiente de variação de fenólicos e flavonóis totais encontradas no extrato, fração aquosa e subfrações de <i>C. sympodialis</i> . ....	69
Tabela 4: Atividade sequestradora de radical DPPH das amostras e Ácido ascórbico.....	72
Tabela 5: Atividade sequestradora de radical ABTS das amostras e trolox. ....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS: Organização Mundial de Saúde

PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

FAEEF: Fração Aquosa do Extrato Etanólico das Folhas

AMPc: monofostafo cíclico de adenosina

OVA: Ovalbumina

IgE: Imunoglobulina E

IFN: Interferon

IL: Interleucina

TPA: 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato

NO: Oxido Nítrico

LPS: Lipopolissacarídeo

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNF-R: Receptor do Fator de Necrose

Tumoral ACF: Adjuvante Completo de Freund

MPO: Mieloperoxidase

ADA: Adenosina-deaminase

LPB: Proteína ligadora de LPS

TLR: Toll-like receptor

MyD: Proteína de diferenciação mieloide

AA: Atividade Antioxidante

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazila

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

mg; miligrama

mL: mililitro

nm: nanômetro

g: grama

CLAE: Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência

µL: microlitro

C18: ocatadecilsilano ANOVA:

Análise de Variância

µg: micrograma

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

Rpm: Rotações por minuto

EAG: Equivalente Ácido Gálico

EQ: Equivalente Quercetina

CE<sub>50</sub>: Concentração Efetiva mediana

DP: Desvio padrão

Epm: Erro Padrão da Média

NOS: Sintase de Óxido Nítrico

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

mm: milímetro

v/v: volume/volume

°C: Graus Celsius

MeOH: Metanol

H<sub>2</sub>O: Água

Uv-vis: Ultravioleta-visível

AS: Atividade Sequestradora

Abs: Absorbância

PBS: Tampão Fosfato

RPMI: Instituto Roswell Park Memorial

NO<sup>2-</sup>: Nitrito

uM: Micromolar

DMSO: Dimetilsulfóxido

TMB: Tetrametilbenzidina

NF-κB: Fator de transcrição nuclear-κB

MHz: Megahertz

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	22
2.1. Plantas medicinais .....	22
2.2. <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	25
2.3. Fracionamento Biomonitorado .....	30
2.4. Mediadores inflamatórios .....	32
2.5. Compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	38
3. OBJETIVOS .....	42
3.1. Objetivo Geral .....	42
3.2. Objetivos Específicos .....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
4.1. Reagentes .....	44
4.2. Equipamentos .....	44
4.3. Obtenção do material vegetal, do extrato etanólico bruto concentrado das folhas e da fração aquosa do extrato etanólico das folhas (FAEEF).....	45
4.4. Fracionamento da FAEEF através do uso de extração em fase sólida.....	46
4.5. Isolamento dos constituintes químicos da subfração isolada com 50% de .....	46
4.6. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados .....	47
4.7. Determinação do teor de fenólicos e flavonóis totais. ....	47
4.8. Determinação da atividade antioxidante .....	48
4.8.1. Atividade sequestradora do radical DPPH .....	48
4.8.2. Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical ABTS <sup>+</sup> .....	49
4.9. Perfil Cromatográfico e Análise por RMN .....	51
4.10. Determinação dos níveis celulares de mediadores inflamatórios .....	51
4.10.1. Animais .....	51
4.10.2. Isolamento e cultura de macrófagos peritoneais. ....	52
4.10.3. Dosagem de óxido nítrico e determinação da viabilidade celular .....	52
4.10.4. Dosagem de citocinas .....	53
4.10.5. Análises estatísticas .....	54
5. RESULTADOS .....	56
5.1. Obtenção das amostras .....	56

5.2.	Perfil Cromatográfico e Análise por RMN.....	57
5.3.	Isolamento do constituinte químico a partir da fração eluída com 50% de metanol.....	60
5.4.	Determinação estrutural de Cs-1.....	60
5.5.	Determinação de Fenólicos e Flavonóis totais .....	66
5.6.	Determinação da atividade antioxidante.....	71
5.6.1.	Atividade sequestradora do radical DPPH .....	71
5.6.2.	Atividade antioxidante pelo método ABTS .....	74
5.7.	Viabilidade Celular e dosagem de Óxido Nítrico .....	77
5.8.	Dosagem de citocinas - TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	81
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>



# *Introdução*

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização dos produtos naturais para o tratamento das enfermidades é uma prática bastante antiga e comum no cenário mundial, e com o incentivo à valorização das terapias tradicionais pela Organização Mundial de Saúde esta prática tem sido utilizada como recurso terapêutico muito útil nos programas de atenção primária à saúde.

O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir de espécies nativas da flora brasileira é um dos objetivos principais da Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. Apesar da grande biodiversidade brasileira, há ainda uma escassez de espécies nativas cujo estado atual de conhecimento em termos de estudos farmacológicos pré-clínicos justifique o seu avanço para a fase de estudos clínicos.

A espécie *Cissampelos sympodialis* Eichl. é popularmente conhecida como milona, jarrinha, abuteira e orelha-de-onça. A infusão aquosa das folhas da planta é usada para o tratamento de distúrbios respiratórios, como asma e bronquite, bem como outras doenças inflamatórias como reumatismo e artrite (PORTO et al., 2008; AGRA et al., 2007; BARBOSA-FILHO et al., 1997). Essa espécie possui mais de 20 anos de estudos farmacobotânicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e analíticos acumulados, demonstrando um potencial concreto para a terapia adjuvante ao tratamento da asma. Os ensaios farmacológicos realizados até o momento indicam que a fração aquosa do extrato etanólico das folhas (FAEEF), por via intraperitoneal, oral ou por inalação na forma de aerossol, possui uma atuação multifatorial em diversos alvos relevantes à fisiopatologia da asma, incluindo efeito broncodilatador direto (THOMAS, et al., 1995), efeito imunomodulador com aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, diminuição da migração celular e da produção de imunoglobulina E (IgE) (CERQUEIRA-LIMA et al., 2010) e diminuição da produção de muco (BEZERRA-SANTOS et al., 2012).

Entretanto, uma lacuna importante neste rico histórico de estudos pré-clínicos persiste. Assim, embora os estudos químicos, de padronização e controle de qualidade tenham sido realizados com o extrato etanólico das folhas, e a ação farmacológica seja parcialmente atribuída ao alcaloide warifteína presente no extrato etanólico a partir do qual a FAEEF é obtida, nenhum estudo químico foi dirigido especificamente à FAEEF, e é pouco provável, dada à solubilidade desta classe de alcaloides terciários, que warifteína esteja presente na FAEEF em concentração que justifique a atividade farmacológica demonstrada por esta fração.

Sendo assim, é provável que existam outras substâncias presentes na FAEEF responsáveis pelo seu efeito farmacológico. O fracionamento químico biomonitorado pretende preencher a lacuna acima discutida.

# *Revisão da Literatura*

---

---

Gomes, A. N. P.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Plantas medicinais

Ao longo dos tempos os seres humanos têm contado com a natureza para atender a suas necessidades básicas, para o tratamento de um largo espectro de doenças. As plantas, em particular, têm formado a base de sofisticados sistemas tradicionais de medicina, com os primeiros registros, que datam de cerca de 2600 a.C., documentando o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas, na Mesopotâmia (CRAGG e NEWMAN, 2013). No Brasil, a utilização de ervas medicinais tem na prática indígena suas bases, que influenciada pela cultura africana e portuguesa, gerou uma vasta cultura popular (ALVES e SILVA, 2003).

O uso correto de plantas medicinais é uma das proposições da Organização Mundial de Saúde (OMS), a qual valoriza o uso das terapias tradicionais, visto seu reconhecimento como forma de tratamento eficaz na atenção básica, podendo ser útil em diversas necessidades da população (TOMAZZONI et al., 2006). Estima que 80% da população mundial depende de plantas como remédio, e a maior parte desse tratamento envolve o uso de extratos e de seus componentes ativos (MAHOMOODALLY e SEEBALUCK, 2013), com uma média de 3,3 bilhões de pessoas utilizando plantas medicinais regularmente (ARUMUGAM et al., 2012). De acordo com um valor aproximado, mais de três quartos da população dos países em desenvolvimento exploraram a fitoterapia para os seus cuidados de saúde primários (LUQMAN et al., 2014).

De forma semelhante no Brasil, cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimento tradicional na medicina tradicional indígena, quilombola, entre outros povos e comunidades tradicionais, seja pelo uso popular na medicina popular, de transmissão oral entre gerações (BRASIL, 2012).

Na Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde realizada em Alma-Ata, em 1978, a OMS passou a reconhecer oficialmente o uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa e paliativa ou fins de diagnóstico, recomendando aos Estados Membros a difusão dos conhecimentos necessários ao seu uso (GONÇALVES et al., 2013). O uso de medicamentos à base de plantas está a aumentar rapidamente em muitos países, especialmente o Brasil, onde a grande biodiversidade é uma fonte potencial de tratamentos novos e mais acessíveis para diversas condições (MAZZARI e PRIETO, 2014).

A produção de itens a base de plantas medicinais apresentam conceitos diversificados na área farmacêutica, que variam de acordo com o estágio tecnológico do processamento, onde planta medicinal é definida como como uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. Esta pode estar no seu estado fresco, que é aquela coletada no momento do uso, e seca, quando foi procedida a secagem. Quando a planta coletada e seca, na sua forma íntegra, rasurada, triturada, ou pulverizada podendo ser estabilizada ou não, denomina-se droga vegetal, sendo esta definida como, planta medicinal ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica. O derivado vegetal, outro termo muito usado na área, é por sua vez, o produto da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contenha as substâncias responsáveis pela ação terapêutica. Estes compreendem a matéria-prima vegetal (BRASIL, 2014).

Medicamento é o produto industrializado ou manipulado, tecnicamente elaborado, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, enquanto medicamento fitoterápico é aquele obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja eficácia e segurança sejam baseados em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (BRASIL, 2014).

Com a publicação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos (PNPMF) através do Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006, o Brasil passou a adotar uma série de iniciativas para incentivar o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir de espécies nativas como estratégia de valorização de sua biodiversidade. Essa política estabeleceu as linhas de ações prioritárias para o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, com o

objetivo de consolidar as iniciativas relevantes no país e as recomendações nacionais e internacionais sobre o tema. A expectativa é minimizar a dependência tecnológica do Brasil no setor e estabelecer uma posição de destaque do país no cenário internacional (BRASIL, 2006).

A venda de medicamentos fitoterápicos em 2005 aumentou 15% contra 4% de medicamentos sintéticos, em 2008 o mercado de fitoterápicos encontrava-se formado por cerca de duzentos laboratórios fabricantes no Brasil, movimentando na faixa de seiscentos milhões de reais, o que equivalia 6,7% das vendas (ALVES et al., 2008; RODRIGUES, 2005). Em 2011, o mesmo movimentou cerca de 1,1 bilhão de reais, e teve um aumento de 13 % em relação a 2010, o que evidencia uma expansão relevante desse tipo de produto (ALVES, 2013).

Levando em conta a riqueza da biodiversidade brasileira, políticas que visem o incentivo do uso apropriado de medicamentos fitoterápicos podem conduzir a um avanço nas pesquisas com plantas já utilizadas pela população, que ainda não possuem comprovação científica de eficácia de segurança, além de ser uma ferramenta a mais para tratamento de uma diversidade de enfermidades (GLÓRIA, 2012).

Em que pesem os avanços alcançados como resultado desta política, como a publicação do formulário nacional de fitoterápicos, atualização das monografias de várias plantas medicinais na Farmacopeia Brasileira e a atualização do marco regulatório envolvendo o registro de medicamentos fitoterápicos, é também de reconhecimento geral por parte daqueles envolvidos na pesquisa de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, a escassez de espécies nativas com estudos farmacobotânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e principalmente clínicos, em estágio de conhecimento que permita o seu avanço rumo ao seu desenvolvimento como medicamento fitoterápico que atenda aos requisitos de segurança, eficácia e qualidade que são necessários ao registro de qualquer medicamento para uso humano. Neste sentido, é preciso valorizar os escassos exemplos de espécies que possuem estudos que permitam o rápido avanço em direção a ensaios clínicos e ao seu registro.

## 2.2. *Cissampelos sympodialis*

*Cissampelos sympodialis* pertence à família Menispermaceae que segundo Jacques e Bertolino (2008), é composta por 71 gêneros e 520 espécies. No Brasil existem cerca de 16 gêneros e 110 espécies, tendo a Amazônia como seu maior centro de distribuição. Os representantes dessa família apresentam uma grande diversidade de hábitos, sendo constituídos em sua maioria por trepadeiras, mas abrangem também ervas arbustos e raramente árvores (ORTIZ et al., 2007).

O gênero *Cissampelos* possui uma rica história de uso tradicional sendo que suas espécies são usadas por suas propriedades terapêuticas e toxicológicas, tendo uma ampla distribuição global que abrange os cinco continentes, bem como várias ilhas (SEMWAL et al., 2014). A figura 1 mostra sua distribuição mundial.

Figura 1: Mapa de distribuição do gênero *Cissampelos*

<http://www.tropicos.org/Name/40009297?tab=maps>



O gênero é um dos maiores pertencentes à família Menispermaceae, compreendendo cerca de 21 espécies (SEMWAL, 2014), principalmente em regiões tropicais, sendo 9 encontradas no Brasil, e destas, 5 ocorrem no nordeste: *C. sympodialis*, *C. glaberrima*, *C. ovalifolia*, *C. pareirae* e *C. andromorpha*. As semelhanças morfológicas entre as espécies de *Cissampelos* são notáveis, tornando difícil suas identificações (PORTO et al., 2011).

A espécie *C. sympodialis* (Figura 2) é uma trepadeira endêmica do Brasil podendo ser encontrada na região Nordeste do país nos estados: Paraíba, Ceará, Alagoas, Bahia, podendo alcançar até o norte de Minas Gerais (CAVALCANTI et al., 2013). É popularmente conhecida como —jarrinhall, —orelha-de-onçall, —milonall ou —abuteirall (PORTO et al., 2008). Na Paraíba, a infusão aquosa das folhas da planta é usada para o tratamento de distúrbios respiratórios, como asma e bronquite, bem como outras doenças inflamatórias como reumatismo e artrite (AGRA et al., 2007; BARBOSA FILHO et al., 1997).

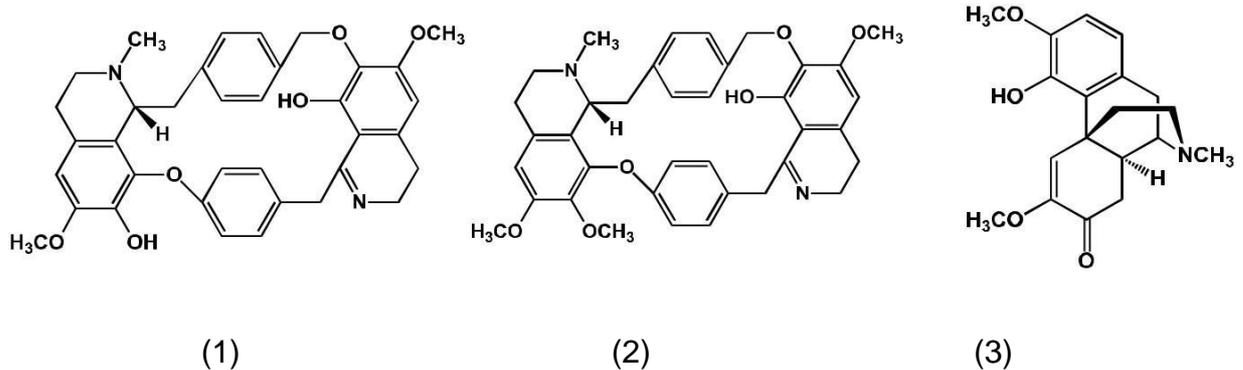
Figura 2: Detalhe das folhas e frutos da espécie *Cissampelos sympodialis*



O gênero *Cissampelos* é caracterizado fitoquimicamente pela presença de alcaloides, sendo que um total de 53 alcaloides de 7 diferentes classes estruturais são reportados na literatura (BARBOSA FILHO et al., 1997). Estudos químicos da espécie levaram ao isolamento e elucidação estrutural de uma série de alcaloides, dentre os quais se destacam: warifteína (CORTES et al., 1995) e metilwarifteína

(BARBOSA FILHO et al., 1997) ambos alcaloides bisbenzilizoquinolínicos, e milonina (FREITAS et al., 1995) com esqueleto morfinâmico, mostrados na Figura 3.

Figura 3: Estrutura química da warifteína (1), metilwarifteína (2) e milonina (3).



Foi descrito em estudo recente um método simultâneo de quantificação dos três alcaloides no extrato etanólico das folhas, através de cromatografia líquida de alta eficiência (MARINHO et al., 2012). O método foi desenvolvido para avaliar a concentração dos mesmos durante o desenvolvimento vegetativo da planta, e observou-se que os alcaloides atingiram concentração mínima nas folhas durante desenvolvimento dos frutos, ao mesmo tempo em que foram encontrados warifteína e metilwarifteína nos frutos, sugerindo que a biossíntese foi desviada das folhas para os frutos durante a maturação.

Estudos pré-clínicos realizados com a fração aquosa do extrato etanólico das folhas (FAEEF) de *C. sympodialis* vem confirmando seus efeitos imunomoduladores, além de atividade anti-inflamatória e antialérgica (LIMA et al., 2014). A FAEEF tem ação em múltiplos alvos relevantes para o processo de fisiopatologia da asma, incluindo um efeito broncodilatador direto equipotente à aminofilina (THOMAS et al., 1995), e inibição da produção de muco (BEZERRA-SANTOS et al., 2012).

Ensaio farmacológicos *in vitro* demonstraram a ação espasmolítica do extrato etanólico em músculo liso, onde se observou um aumento de AMPc em cultura de células de musculatura lisa de traqueia e ainda inibição do

broncoespasmo induzido por histamina em cobaia normal, além de inibir a resposta anafilática induzida por antígeno em cobaia sensibilizada com ovalbumina (OVA) (THOMAS et al., 1997). A warifteína e metilwarifteína também produziram efeitos espasmolíticos, mas com potências bem inferiores à fração aquosa do extrato etanólico das raízes (CORTES et al., 1995; FREITAS et al., 1996) o que sugere que esses alcaloides não são os únicos responsáveis por essa atividade. Estudos feitos com neutrófilos periféricos humanos também indicaram que a FAEEF tem a capacidade de inibir o processo de degranulação induzido por N-formilmetionil-peptidase, além de aumentar os níveis de AMPc e a atividade da proteína quinase A dependente de AMPc em neutrófilos (THOMAS et al., 1999).

Estudos farmacológicos realizados com a finalidade de avaliar a atividade antialérgica através da administração oral da FAEEF em camundongos sensibilizados por ovalbumina, resultaram na diminuição dos níveis de IgE total e específica, além de do aumento de IFN- $\gamma$  e IL-10 e inibição de resposta proliferativa de células esplênicas (BEZERRA-SANTOS et al., 2004). Também por administração oral, a warifteína demonstrou ser um componente ativo responsável pelo efeito antieosinofílico, pois reproduziu o efeito inibitório na eosinofilia alérgica e na produção de leucotrienos em camundongos sensibilizados com ovalbumina. O pré-tratamento via oral com *C. sympodialis* reduz eosinofilia e neutrofilia pleural após 24h de desafio alérgico, de maneira dose-dependente (BEZERRA-SANTOS et al., 2006).

A ação antialérgica também foi investigada através de modelo envolvendo o ácaro *Blomia tropicalis*, através do qual foi verificada a diminuição da alergia pela FAEEF através da diminuição de IgE, aumento de eosinófilos, inibição da migração de eosinófilos, e aumento de IL-10, podendo ser este último o principal contribuinte da ação antialérgica (CERQUEIRA-LIMA et al., 2010; VIEIRA et al., 2013). Outros resultados mostraram que camundongos tratados com warifteína além de reduzir respostas associadas à alergia, como edema de pata e choque anafilático induzidos por OVA, também demonstraram atividade nociceptiva (COSTA et al., 2008).

Outro estudo realizado tanto com o extrato hidroalcoólico de *C. sympodialis* quanto com a warifteína demonstrou que quando testados em modelo de inflamação pulmonar induzido por OVA, houve uma redução e inibição significativas de IL-13 e

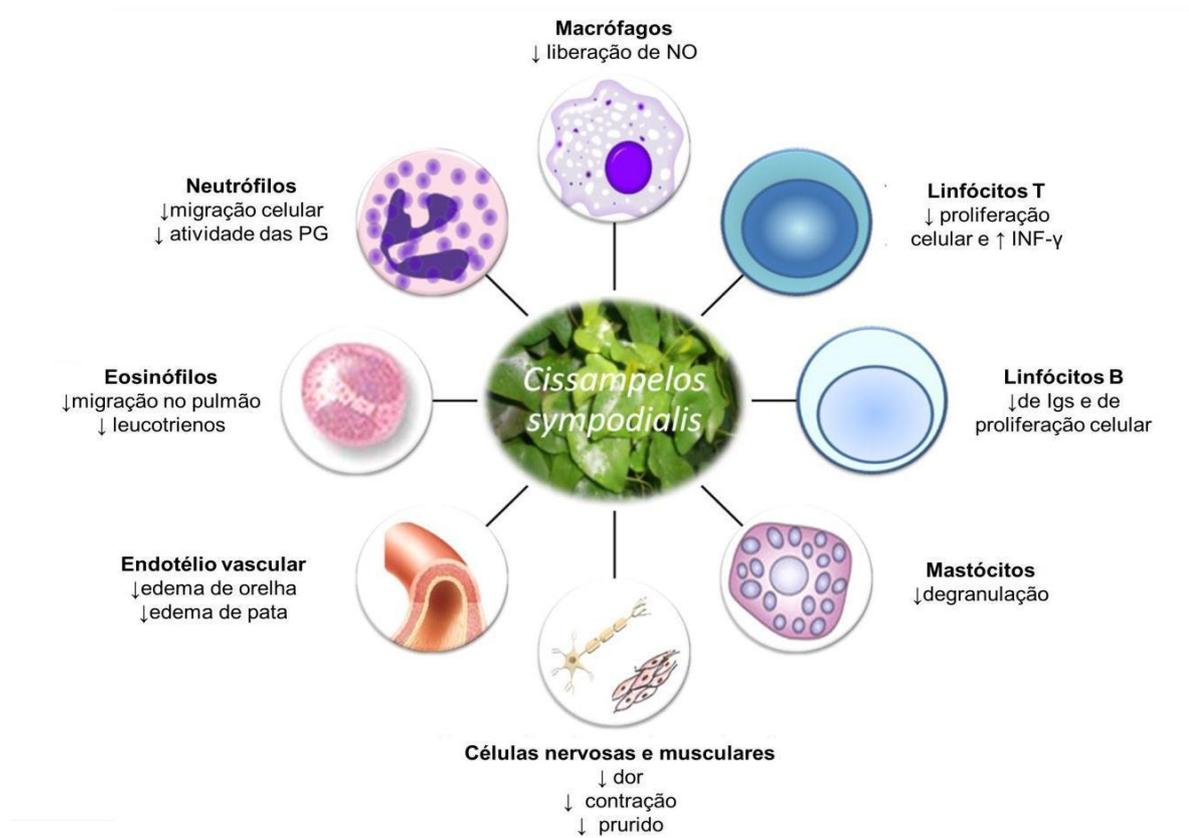
da hiper-reatividade das vias aéreas respectivamente, além da redução de produção de muco (BEZERRA-SANTOS et al., 2012).

Efeitos imunomoduladores atribuídos a espécie, são devido a estudos que demonstraram que o tratamento com a fração aquosa do extrato etanólico de *C. sympodialis* induziu um aumento na produção de IL-10 e IL-4 em células esplênicas de camundongos Balb/c estimulados com concanavalina-A, o que levou à inibição da proliferação da resposta das células-T (PIUVEZAM et al., 1999), sendo também verificado aumento de IL-10 em macrófagos infectados por *T. cruzi*, inibindo assim a atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais normais ou recrutados, corroborando sua atividade antialérgica e efeito imunomodulador (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003; BEZERRA-SANTOS et al., 2006).

Investigações sobre a atividade anti-inflamatória de FAEEF foram realizadas em modelos experimentais de inflamação aguda utilizando agentes flogísticos em camundongos Swiss. Os resultados demonstraram que a FAEEF promove inibição da formação de edema de orelha induzido por TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato) ou capsaicina, além de inibir a migração de neutrófilos para cavidade intraperitoneal induzido por carragenina (BATISTA-LIMA et al., 2001).

De maneira geral, os estudos farmacológicos realizados com a espécie já demonstraram atuar em diversos alvos importantes relacionados ao processo fisiopatológico da asma e desordens inflamatórias. A figura 4 resume os alvos terapêuticos descritos anteriormente.

Figura 4: Resumo dos alvos terapêuticos de *Cissampelos Sympodialis*



Adaptado de (BEZERRA-SANTOS et al., 2012)

### 2.3. Fracionamento Biomonitorado

Entre os fatores importantes durante a pesquisa de novos princípios ativos derivados de produtos naturais, destaca-se primordialmente a interação entre a química e a farmacologia. Conforme a colaboração das duas áreas se aproxima, mais rápido e de maneira consistente serão alcançados os resultados esperados (CECHINEL e YUNES, 1998).

Dentre as recentes estratégias utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas, o isolamento e identificação de substâncias com potencial terapêutico extraídas de plantas e outros produtos naturais, se destaca como uma das mais

importantes. O estudo biomonitorado ou bioguiado, como também é conhecido, busca o conhecimento da estrutura dos constituintes químicos de uma planta, com ênfase nas substâncias/frações com atividade biológica ou farmacológica e não somente com foco central no isolamento e elucidação estrutural, como na fitoquímica clássica (PINTO et al., 2002).

A análise de substâncias ativas é complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção em produtos naturais são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL e YUNES, 1998). Neste sentido, torna-se indispensável analisar a potência das frações, subfrações e das substâncias puras dos extratos. Este procedimento, chamado de monitoramento bioguiado, permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (CABRAL, 2008). Para isso, são utilizadas diferentes técnicas, selecionadas de acordo com as características dos compostos a serem isolados, dentre essas técnicas a liofilização está inserida com forma de melhorar a estabilidade da amostra a ser trabalhada.

A liofilização ou secagem pelo frio —*freeze drying*ll, é um processo em que a água é eliminada por sublimação, para isso a amostra é previamente congelada e o método é caracterizado por não secar a elevadas temperaturas como em outros processos de secagem, e por isso apresenta uma série de vantagens quanto à manutenção das características originais dos produtos. Em seguida, a amostra é colocada no liofilizador, à vácuo, e ocorre a desidratação com redução da pressão a 1 mmHg, condição que deve ser mantida até o final da secagem. Outra vantagem importante da técnica é o aumento da estabilidade por meio da diminuição da atividade de água, que minimiza a deterioração da amostra (OLIVEIRA et al., 2012).

O ensaio biomonitorado consiste na purificação, isolamento e identificação dos metabólitos presentes em extratos e frações semi-purificadas, a fim de isolar os metabólitos bioativos. Para isso, são utilizadas diferentes técnicas cromatográficas, que são selecionadas de acordo com as características dos compostos a serem isolados. Após cada fracionamento, as diferentes frações obtidas são monitoradas através dos mesmos ensaios de atividade farmacológica, com o objetivo de detectar em qual fração localizam-se os principais compostos bioativos (HOUGHTON, 2000).

É necessário que espécie estudada possua resultados que demonstrem sua ação sobre a atividade farmacológica escolhida.

A principal vantagem da realização de um fracionamento biomonitorado é que conforme o fracionamento é feito e as frações/subfrações são obtidas, estas podem ser submetidas a ensaios biológicos e/ou químicos para se determinara onde a atividade está concentrada, e desta forma, trabalhar apenas com as frações de interesse, a fim de que a atividade não seja perdida durante o processo de isolamento. Outras vantagens do fracionamento biomonitorado são:

- Evitar descarte dos compostos bioativos durante os processos de fracionamento e isolamento cromatográfico em extrato bruto cuja diversidade química é grande;
- Economia de solvente e rapidez no isolamento a partir de critérios biológicos de inclusão e exclusão de frações e subfrações;
- Viabilidade do estudo de substâncias bioativas em produtos naturais, que possuem grande complexidade química, uma vez que permite a exclusão de grande número de substâncias químicas, sem atividade biológica, presente em frações e subfrações.

## **2.4. Mediadores inflamatórios**

Existe uma variedade de mediadores envolvidos na resposta inflamatória, os quais derivam principalmente de precursores plasmáticos e celulares. De acordo com suas propriedades bioquímicas podem ser classificados em: Aminas vasoativas, peptídeo vasoativo, mediadores lipídicos, quimiocinas, enzimas proteolíticas e citocinas (CRUVINEL et al., 2010).

A atividade eficaz dos produtos naturais pode-se iniciar com a participação do sistema imunológico. Dentro deste sistema, os macrófagos são células pertencentes à imunidade inata que possuem várias funções tais como a eliminação de corpos estranhos, apresentação de antígenos e ativação das células T através da produção

de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Uma das principais moléculas liberadas pelos macrófagos em processos inflamatórios é o óxido nítrico (NO) (ABBAS et al., 2003; CRUVINEL et al., 2010). O papel principal deste mediador como mensageiro e molécula efetora em uma variedade de tecidos tem sido extensivamente estudado (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

Em reações inflamatórias, citocinas pró-inflamatórias levam à expressão da sintase de NO induzível em monócitos / macrófagos, granulócitos, neutrófilos e muitas outras células; no caso de infecção bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS) é outro forte indutor de expressão. Em consequência, grandes quantidades de NO são sintetizados, superior à produção fisiológica NO em até 1000 vezes. A superprodução de NO como um mediador inflamatório pode conduzir à destruição de tecidos tais como em doenças inflamatórias autoimunes (SHARMA, AL-OMRAN E PARVATHY, 2007). Portanto, novas drogas que tenham como atividade a inibição da produção de NO podem ser importantes fontes de tratamento de doenças inflamatórias.

Além do NO, outras moléculas estão envolvidas em processos inflamatórios. As citocinas são pequenas proteínas secretadas pelas células em resposta a microrganismos e outros antígenos, e têm um efeito específico sobre as interações e comunicações entre células, podendo atuar sobre as células que as secretam (ação autócrina), em células vizinhas (ação parácrina), ou em alguns casos, em células distantes (ação endócrina) (ZHANG e AN, 2007). Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica, e dessa forma, influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011).

Macrófagos e linfócitos eram considerados as principais fontes de citocinas; entretanto, foi demonstrado que outras células do sistema imune bem como células nucleadas podem secretar citocinas sob certas circunstâncias (TRAYHURN & WOOD, 2004). As principais citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células fagocíticas ativadas incluem o Fator de Necrose Tumoral (TNF) - $\alpha$  e a Interleucina (IL) -1 $\beta$ .

O TNF- $\alpha$  foi descoberto em 1975 e é considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do organismo. É secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo a presença de LPS o principal estímulo para que isto ocorra (MAYER et al., 2010). Após ser produzido e liberado, o TNF- $\alpha$  irá ligar-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, onde vai promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (VITALE e RIBEIRO, 2007).

A Interleucina (IL)-1 $\beta$  é um dos mediadores centrais de reações inflamatórias e apresenta função semelhante à do TNF- $\alpha$ , sendo importante na resposta do hospedeiro a infecções e outros estímulos inflamatórios. IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória, e induz respostas inflamatórias sistêmicas e locais, além de induzir à expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e quimiocinas, levando à infiltração de células inflamatórias e imunocompetentes (DINARELLO, 2009). Sua principal fonte celular são fagócitos mononucleares ativados, sendo também produzida por neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais. Em baixa concentração, atua como mediadora de inflamação local, agindo nas células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de superfície que medeiam a adesão de leucócitos, como ligantes para integrinas. Quando secretada em maiores quantidades, exerce efeitos endócrinos, induzindo febre e síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (BACHIEGA et al., 2012).

Alguns modelos experimentais consistem na indução de uma resposta inflamatória aguda e/ou crônica, de forma que possibilitam a identificação de múltiplos mediadores e células que têm papel importante na indução de vários sinais e sintomas associados (COLLINS, 2000).

Dentre os ensaios que induzem inflamação, uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a atividade de fármacos anti-inflamatórios está baseada na habilidade de inibir o edema produzido na pata traseira de rato por injeção de agente flogístico. Os materiais flogísticos mais frequentemente utilizados são carragenina, formalina, dextrano, albumina de ovo e levedo de cerveja. O método consiste em induzir edema na pata esquerda traseira do rato e compará-la com a pata colateral, a qual é considerada o controle do ensaio. O edema é, então, expresso pela diferença de

volume entre as patas, medido por pletismometria, após um determinado período de tempo (LENZ, 2009).

Outro ensaio é a indução de artrite por Adjuvante Completo de Freund (ACF), o qual é utilizado para determinações qualitativas e quantitativas da atividade anti-inflamatória. Esse modelo propicia condições clínicas e histológicas similares a osteoartrite humana e tem sido comumente usado em ensaios em que se deseje produzir dor e inflamações reumáticas. O ACF pode consistir de diferentes combinações de substâncias, a mais comum é a mistura de óleo mineral não metabolizável, um surfactante e uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*), essa combinação tem sido usada há muitos anos e é considerada a mais efetiva para intensificar uma resposta imunológica a um antígeno (HEGEN, et al. 2008).

A bolsa de ar no dorso, também conhecida como *air pouch*, é um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação anti-inflamatória. Esta técnica é de fácil execução e permite a avaliação de diversos parâmetros inflamatórios como, por exemplo, estudo da celularidade, exsudação, além de mediadores inflamatórios (citocinas, NO, mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA)). O modelo da bolsa de ar é o modelo animal que mimetiza a artrite reumatoide. Neste modelo, a indução da inflamação pela carragenina na bolsa de ar subcutânea forma uma membrana com características semelhantes à membrana sinovial inflamada de pacientes com artrite reumatoide. A introdução da carragenina induz um processo inflamatório com as mesmas características e curso da inflamação observada na artrite reumatoide, com infiltração de polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios (VIGIL, 2008).

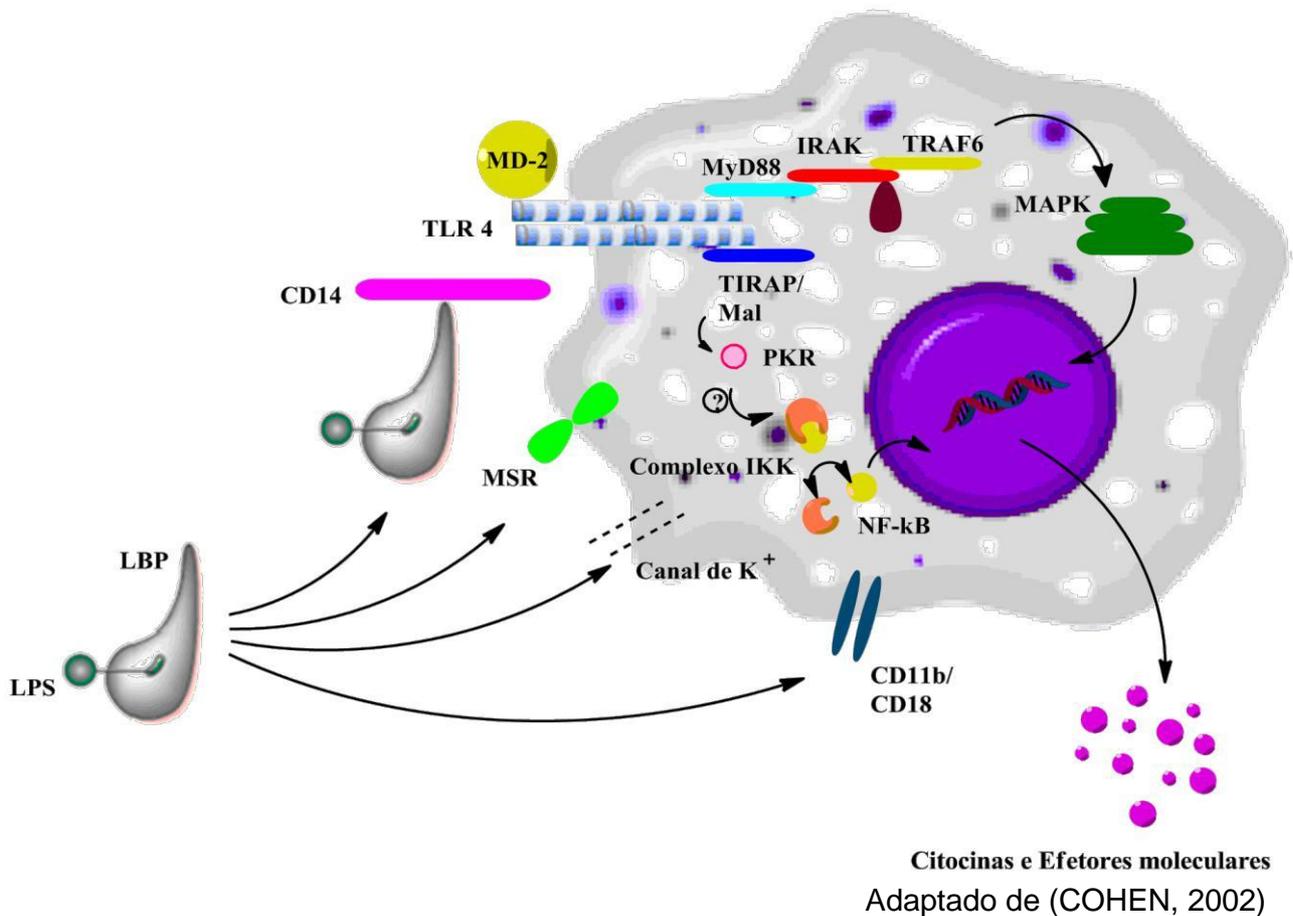
Outro método utilizado é o ensaio do granuloma, que consiste na implantação de *pellets* de algodão no dorso de ratos, e se caracteriza pela formação de cápsula fibrosa vascularizada, fibroblastos e células mononucleares infiltrantes. Os passos envolvidos na formação do granuloma envolvem inicialmente, acúmulo de fluido e material proteico, com infiltração de neutrófilos. O granuloma ao final do sexto dia é caracterizado pela formação de cápsula fibrosa vascularizada, contendo fibroblastos e células mononucleares infiltrantes. O efeito do fármaco testado é avaliado pelo

tamanho da cápsula fibrosa desenvolvida: quanto menor a cápsula fibrosa desenvolvida, mais intenso é o efeito anti-inflamatório do fármaco testado (PEREIRA et al., 2013).

A inflamação induzida por LPS *in vitro* em cultura de macrófagos é um dos modelos bem estudados. O LPS também conhecido como endotoxina é uma molécula altamente tóxica e inespecífica derivada da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa.

O processo de ativação celular induzido pelo LPS se deve ao reconhecimento dessa molécula pelo receptor de membrana TLR4. Para que o LPS ative esse receptor é necessário que ocorra interação do LPS com a proteína ligadora de LPS (LPB) seguida da interação do complexo LPS-LPB com CD14, que pode estar ancorado à membrana ou solúvel, dessa forma formando um composto ternário, que então será reconhecido pelo TLR4. Por fim ocorre a transdução de sinal para o meio intracelular com o auxílio da proteína MD2, uma proteína específica para TLR4, seguida pela ativação de uma via dependente ou não de MyD88, que é uma proteína adaptadora. A ativação dependente de MyD88 envolve a ativação de uma série de proteínas que culmina na translocação do Fator de transcrição nuclear (NF) - $\kappa$ B e consequente produção de mediadores inflamatórios como prostanóides, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio, NO, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , (Figura 5). Esta ativação é seguida de uma resposta anti-inflamatória pela indução da citocina IL-10 (SANDRI SILVANA, 2008)

Figura 5: Reconhecimento do LPS pelos macrófagos



Em relação ao sistema imune, há grande interesse em pesquisas etnofarmacológicas que relacionem o efeito imunomodulador de plantas medicinais a diversas condições fisiopatológicas, como por exemplo, a inflamação (SFORCIN, 2007), a qual é benéfica quando aguda e regulada, porém passa a ser prejudicial quando crônica e exacerbada, situação esta em que a modulação exógena do sistema imune é desejável. Neste contexto, encaixam-se os produtos naturais e seus compostos isolados que possuem efeito imunomodulador, destacando-se sua ação sobre as citocinas – mediadores importantes da resposta imune e inflamatória.

Considerando que há uma grande quantidade de mediadores produzidos após o desencadeamento da resposta inflamatória, o parâmetro da inflamação pesquisado por nós neste trabalho foi a produção de citocinas, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e o modelo utilizado em nosso trabalho incluiu o desafio de macrófagos com LPS.

## 2.5. Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Nos últimos anos vem crescendo a busca de novos antioxidantes naturais principalmente por prevenir a deterioração de alimentos e minimizar o dano oxidativo às células vivas. Existem várias classes de substâncias antioxidantes naturais, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos (SOUSA et al., 2007).

Um estudo realizado por Cavalcanti, et al. (2013) através de screening fitoquímico com quatro lotes de folhas de *C. sympodialis*, demonstrou além dos alcaloides, a presença de compostos fenólicos representados principalmente por Taninos e Flavonoides no extrato hidroalcoólico das folhas. As reações de identificação das classes químicas do metabolismo secundário detectaram além de alcaloides e flavonoides, taninos, esteroides, e um baixo teor de saponinas. A análise da prospecção química também demonstra diferença entre os lotes analisado, o que se deve a variações temporais e espaciais, decorrentes da sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, entre outros, que estejam relacionados com a alteração da síntese de metabólitos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As plantas sintetizam e acumulam uma vasta diversidade de compostos fenólicos, que são um grupo de metabólitos secundários e apresentam grande variedade de funções nos vegetais (POVH, 2012). Os compostos fenólicos podem ser agrupados em diferentes categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados, hidrolisáveis e ligninas (NACZK, M.; SHAHIDI, F., 2004). A constatação de que os vegetais possuem substâncias biologicamente ativas que trazem benefícios à saúde tem impulsionado pesquisas voltadas na identificação de produtos naturais com potencial antioxidante (POVH, 2012).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se a sua estrutura química, e estes podem agir tanto na iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formado pela ação desses antioxidantes são

relativamente estáveis devido a ressonância do anel aromático apresentada por essas substâncias (SOUSA et al., 2007). Estudos realizados com os compostos fenólicos demonstram que além da sua capacidade antioxidante, há um possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). De maneira geral, a ação benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana vem sendo relacionada com a sua atividade anti-inflamatória e com a atividade que impede, não só a aglomeração das plaquetas sanguíneas, mas também a ação de radicais livres no organismo (SILVA, et al., 2010).

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células impulsionaram a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES et al., 2010).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (MORENO, 2002). Podem também ser classificados em ensaios baseados em estudos de cinética química (método direto) e ensaios mediados pela transferência de elétrons (método indireto), métodos indiretos como DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) vêm sendo bastante utilizado na determinação da atividade antioxidante de alimentos e produtos naturais devido a sua relativa simplicidade o que propicia a aplicação em rotinas de laboratório (TOMEI e SALVADOR, 2007).

Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes alvos de oxidação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a real atividade antioxidante de um composto (ALVES et al., 2010). Deve-se portanto, escolher os métodos mais comumente aceitos, validados e padronizados, com informações acumuladas na literatura.

Os resultados obtidos através dos métodos de determinação da atividade antioxidante podem ser associados à quantidade de compostos fenólicos presente na amostra pela correlação de Pearson. Quando as variáveis cuja relação se pretende estudar são quantitativas, podem ser analisadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (R), que é uma medida da associação linear entre variáveis quantitativas e varia entre -1 e 1 (MAROCO E BISPO, 2003). Quanto mais próximo estiver dos valores extremos, tanto maior é a associação entre as variáveis. Se o R de Pearson apresentar sinal positivo significa que as duas variáveis variam no mesmo sentido, mas se apresentar sinal negativo significa que as duas variáveis variam em sentido inverso. Para Dancey e Reidy (2006) valores da correlação de Pearson obtidos entre 0,10 e 0,30 apresentam uma correlação fraca; entre 0,40 e 0,60 são considerados moderados; e entre 0,70 e 1 são fortes.

# *Objetiva*

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Realizar um fracionamento químico biomonitorado da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis* com a finalidade de caracterizar quimicamente a fração farmacologicamente ativa da espécie.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Obter a fração aquosa do extrato etanólico das folhas (FAEEF) de *C. sympodialis* na forma liofilizada, a partir de um extrato etanólico das folhas, padronizado em warifteína, metilwarifteína e milonina.
- Realizar subfracionamento da FAEEF através do uso de cartucho de extração em fase sólida (SPE).
- Submeter as subfrações obtidas por SPE, a bioensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação dos níveis celulares de óxido nítrico (NO), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais.
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonóis totais no extrato, fração aquosa e subfrações.
- Avaliar a atividade antioxidante em todas as amostras

# *Metadologia*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

Os solventes Acetonitrila, Metanol foram da Tedia® (Tedia Brazil), grau HPLC, e a água ultrapura foi obtida a partir do sistema de purificação Purelab Option-Q (Elga®). Os reagentes para os ensaios imunológicos eram grau reagente ou estéreis, quando necessário. Os reagentes e materiais utilizados nos ensaios imunológicos foram os seguintes: azul de Tripán (Sigma-Aldrich®); kit de ELISA para a detecção das citocinas (eBioscience®); RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®); solução de tampão fosfato (Sigma®) Soro Bovino Fetal (Gibco®); Placas de ELISA com 96 poços (Costar®).

### 4.2. Equipamentos

<b>Equipamento</b>	<b>Modelo/marca</b>
<b>Estufa de ar circulante</b>	Olidef® C2
<b>Ultrassom</b>	Unique® (40 kHz)
<b>Liofilizador</b>	Teroni® LS 3000 C
<b>Sistema de filtração de solvente</b>	Phenomenex®
<b>Manifold</b>	Phenomenex®
<b>Rotaevaporador</b>	Buchi® R11
<b>Balança</b>	Shimadzu® AW 220

---

<b>Centrífuga</b>	IEC® Centra MP4R
<b>Espectrofotômetro ELISA</b>	Elx808 Absorbance Microplate Reader®
<b>Estufa CO2</b>	ShellLab® (SL)
<b>CLAE</b>	Shimadzu®: degaseificador (DGU-14A); bomba (LC-10ADvp); autoinjeter (SIL-10)ADvp); forno (CTO-10)ASvp); detector UV (SPD-10ADvp); controlador (SCL-10Acp). Shimadzu®: controlador (SCL-10Avp); bombas (LC-6AD); detector DAD (SPD-M10Avp)
<b>PLC 2020</b>	Gilson®
<b>Espectrômetro</b>	Varian Mercury 200 MHz

---

#### **4.3. Obtenção do material vegetal, do extrato etanólico bruto concentrado das folhas e da fração aquosa do extrato etanólico das folhas (FAEEF).**

O material vegetal foi coletado no mês de Agosto no horto do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, que possui cultivo botanicamente certificado (Voucher Agra 1476, depositado no Herbário Lauro Pires Xavier), a partir de plantas adultas, antes do aparecimento dos frutos. O mesmo foi seco em estufa de ar circulante a  $40 \pm 3$  °C e pulverizado através de moinho de facas. Após esta etapa foi realizado o processo de tamisação das folhas secas e partículas com tamanho entre 0,425 e 0,500 mm foram coletadas. O material vegetal foi submetido à maceração com uma solução hidroalcoólica (80:20, v/v) na proporção de 9:1 (v/v) de líquido extrator para droga vegetal seca, durante 48 horas com renovação do mesmo volume de solvente. O extrato foi concentrado por evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador à temperatura de 50 °C. Uma partição do extrato

etanólico concentrado das folhas com água foi realizada, com a auxílio de um aparelho de ultrassom, na proporção de 1g de extrato para cada 30 mL de água para obtenção da fração aquosa do extrato etanólico das folhas (FAEEF), que posteriormente foi congelada a -10 °C e liofilizada (CAVALCANTI, 2013).

#### **4.4. Fracionamento da FAEEF através do uso de extração em fase sólida.**

Para a etapa de fracionamento da amostra foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida com fase estacionária de sílica de fase reversa (C-18, 5 g/20 mL) do tipo Gigatube (Phenomenex, Torrance EUA). A FAEEF foi aplicada ao cartucho de extração em fase sólida e eluída com solventes em grau decrescente de polaridade (75% H<sub>2</sub>O: 25% MeOH, v/v), (50% H<sub>2</sub>O: 50% MeOH, v/v), (75% MeOH: 25% H<sub>2</sub>O, v/v) e (100% MeOH, v/v) utilizando um manifold com regulagem de vácuo. As subfrações obtidas foram secas por evaporação sob uma corrente de nitrogênio a 50 °C.

#### **4.5. Isolamento dos constituintes químicos da subfração isolada com 50% de Metanol.**

Para o isolamento dos constituintes químicos, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em um PLC-2020 da Gilson<sup>®</sup> e uma coluna preparativa C-18 (250 X 10mm DI, 5 µm). A fase móvel utilizada consistiu de misturas binárias de água e metanol. Como condições cromatográficas para separação utilizou-se uma eluição do tipo gradiente iniciando com 30% de metanol a 35% durante 15 minutos, passando de 35% a 40% em 25 minutos, e aumentando até 50% durante 5 minutos. O fluxo de fase móvel por minuto foi de 4 mL e comprimento de onda de 250 nm.

#### **4.6. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados**

A determinação estrutural dos constituintes químicos foi realizada através Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury, operando para hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) a 500 MHz e para carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) a 125 MHz, com a utilização de solventes delterados. Apresentando deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz.

#### **4.7. Determinação do teor de fenólicos e flavonóis totais.**

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos, fração aquosa e subfrações foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu, segundo metodologia previamente descrita (PAPOTTI et al., 2010).

A uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato, fração aquosa e suas subfrações (1,0 mg/ml) adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin- Ciocalteu (1:10) e 2,0 mL de uma solução aquosa 4% de carbonato de sódio, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 5 minutos em aquecimento de 50°C, e observou-se a mudança da coloração da solução de amarelo para azul. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorbância a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de um cm de caminho óptico (PAPOTTI et al., 2010).

O teor de fenólicos totais no extrato, na fração aquosa e subfrações foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por 100 mg de extrato, fração aquosa e subfrações.

Para construção da curva de calibração utilizou-se uma solução metanólica do padrão de ácido gálico nas concentrações de 100, 150, 250, 350 e 500 µg/ml.

O teor de flavonóis totais foi determinado segundo adaptação da metodologia descrita na literatura utilizando como reagente o cloreto de alumínio (MIHAI et al., 2012).

Uma alíquota de 400 µL do extrato, fração aquosa e subfrações de *C. sympodialis* (1,0 mg/ml) e 200 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2% foram misturados num balão volumétrico contendo 5 ml de metanol. O volume foi ajustado para 10 ml com metanol. Após 30 minutos foi medida a absorbância a 425 nm contra o branco, a fim de quantificar flavonas e flavonóis (MIHAI et al., 2012).

O teor de flavonas e flavonóis totais no extrato, fração aquosa e subfrações foi determinado utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para quercetina padrão. O resultado foi expresso como mg de equivalentes de quercetina por 100 mg de extrato, fração aquosa e subfrações. Para construção da curva de calibração foi utilizada uma solução metanólica do padrão de quercetina nas concentrações de 5, 10, 30, 50, 100, e 200 µg/mL.

## **4.8. Determinação da atividade antioxidante**

### **4.8.1. Atividade sequestradora do radical DPPH**

A capacidade antioxidante foi determinada utilizando-se o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) segundo método descrito por Garcez et al., 2009, com algumas modificações. A solução do radical DPPH foi preparada pela mistura de 11,82 mg de DPPH em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente antes e durante o uso. As soluções das amostras foram preparadas em metanol na concentração 2 a 1000 µg/mL. Após uma triagem

preliminar, as concentrações finais das amostras variaram entre 1 e 500 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 µg/mL. Cada concentração foi testada em triplicata. As soluções foram agitadas e, após 30 minutos de reação, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 517 nm.

A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\%AS = \frac{\{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\}}{Abs_{controle}}$$

Onde  $Abs_{controle}$  é a absorbância do controle negativo, contendo apenas a solução de DPPH, e  $Abs_{amostra}$  é a absorbância do radical na presença da amostra ou do controle positivo.

A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) obtido pelo programa estatístico GraphPadPrism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da  $CE_{50}$  (concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres)  $\pm$  D.P. (desvio padrão).

#### **4.8.2. Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>**

A solução do cátion radical  $ABTS^{\cdot+}$  foi preparada pela mistura de 2,5 mL de uma solução de ABTS (7,0 mM) com 44  $\mu$ L de uma solução de persulfato de potássio (140,0 mM), ambas em água destilada. A solução foi mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante um período de 12-16 horas antes do uso. Em seguida a solução do radical  $ABTS^{\cdot+}$  foi diluída com etanol (1:80 v/v, aproximadamente) obtendo uma absorbância (A) de  $0,7 \pm 0,05$  no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível. As soluções das amostras foram preparadas em etanol na concentração e 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL. Através de triagem preliminar quantidades apropriadas das soluções da amostra e da solução de  $ABTS^{\cdot+}$  foram transferidos para eppendorfs, o volume foi completado para 500  $\mu$ L com etanol. As concentrações das amostras variaram entre 5 e 200  $\mu$ g/mL. Como substância padrão foi utilizada o trolox nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0  $\mu$ g/mL. Cada concentração foi testada em triplicata. As soluções foram agitadas e, após 6 minutos de reação, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm. O ensaio foi feito em colaboração com a professora Tânia Maria Sarmento da Universidade Federal Rural do Pernambuco.

A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\%AS = \frac{100 \times (Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}}$$

Onde  $Abs_{controle}$  é a absorbância do controle negativo, contendo apenas a solução alcoólica do radical  $ABTS^{\cdot+}$ , e  $Abs_{amostra}$  é a absorbância do radical na presença da amostra ou do controle positivo.

A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) obtido pelo programa estatístico GraphPadPrism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da  $CE_{50}$

(concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres)  $\pm$  D.P. (desvio padrão).

Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPadPrism v.5.

#### **4.9. Perfil Cromatográfico e Análise por RMN**

A FAEEF e as suas subfrações foram submetidas à análise cromatográfica utilizando um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) constituído de duas bombas, um detector de UV-vis e um módulo de controle (Shimadzu, Tokio, Japão). Uma coluna analítica do tipo C-18 (250 X 0,46 mm DI, 5  $\mu$ m) foi utilizada para as separações. A fase móvel utilizada consistiu de misturas binárias de água e acetonitrila ou metanol dependendo da amostra.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$  RMN) foram obtidos empregando-se um espectrômetro Varian Mercury operando na frequência de 200 MHz com DMSO deuterado para dissolver o extrato e as frações.

#### **4.10. Determinação dos níveis celulares de mediadores inflamatórios**

Os ensaios imunofarmacológicos foram feitos em colaboração com a professora Sandra Mascarenhas da Universidade Federal da Paraíba.

##### **4.10.1. Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss de aproximadamente 2 meses de idade. Os animais, provenientes do biotério do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, foram mantidos em um regime de luz de 12 horas e supridos com ração e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA) do CBiotec/UFPB sob parecer nº 0306/13.

#### **4.10.2. Isolamento e cultura de macrófagos peritoneais.**

Os macrófagos utilizados nos experimentos foram recrutados para o peritônio dos camundongos Swiss através da injeção intraperitoneal de 2 mL de solução de tioglicolato de sódio (4%). Após cinco dias, os animais foram eutanasiados e foi realizado o lavado peritoneal com 10 mL de tampão PBS gelado suplementado com 3% de soro fetal bovino. O lavado foi então centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. As células que ficaram sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo (10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico). A contagem e a viabilidade celular foram analisadas em câmara de Neubauer com auxílio de corante azul de Tripán 0,4%.

Em placas de 96 poços, os macrófagos foram cultivados na concentração de  $4 \times 10^5$  células/poço e divididos em diferentes grupos de acordo com o tratamento: LPS (10 µg/mL), subfrações obtidas (3 e 50 µg/mL), na presença e ausência de LPS e somente meio RPMI completo. As concentrações das subfrações foram escolhidas a partir de estudos prévios (PIUVEZAM et al., 1999; CAVALCANTI, 2013). Após a incubação por 24 horas em estufa úmida (5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C) foi determinada a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT, e os sobrenadantes foram coletados para determinação de NO e citocinas.

#### **4.10.3. Dosagem de óxido nítrico e determinação da viabilidade celular**

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada de maneira indireta pela detecção do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) utilizando-se o método de Griess. Os sobrenadantes coletados das culturas de macrófagos foram colocados em placas de 96 poços e adicionados o reagente de Griess. Esse reagente é constituído pela mistura de duas soluções A e B na proporção 1:1, que são preparadas imediatamente antes do uso. A solução A é constituída por: naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v), e a solução B por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). Como padrão foi utilizado uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200  $\mu\text{M}$ . A absorbância de 540 nm foi determinada utilizando um leitor de microplaca. Os resultados em  $\mu\text{moles}$  foram determinados por comparação com a curva padrão.

Após a retirada do sobrenadante para a dosagem de nitrito foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$  de solução de meio RPMI com MTT a 5 mg/mL em todos os poços. Neste método, o MTT, brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais, onde ocorre a formação do cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO e em álcoois ácidos (REILLY et al., 1998). Essas suspensões celulares foram novamente incubadas por 4 horas e após esse período, o sobrenadante foi removido seguindo da adição de 200  $\mu\text{L}$  DMSO em cada poço para dissolver os cristais formados. A viabilidade celular foi quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por espectrofotômetro.

#### **4.10.4. Dosagem de citocinas**

As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram quantificadas pela técnica de ELISA. As metodologias utilizadas para tais dosagens foram às recomendadas pelo fabricante dos kits (eBioscience). Para tal, as placas de ELISA com 96 cavidades receberam 50  $\mu\text{L}$  de anticorpo de captura (para cada citocina específica) diluído em tampão de cobertura (Coating buffer). Em

seguida foram seladas com plástico tipo parafilme e mantidas em repouso durante uma noite (~12 horas) a 4 °C.

Após este período, aspirou-se um volume de 50 µL de cada cavidade seguido das lavagens, que consistiram em adicionar cerca de 250 µL de tampão de lavagem (PBS e Tween 20 0,05 %) em cada cavidade. As placas foram secas sobre papel absorvente para remoção completa de resíduos de tampão. Esse procedimento foi repetido por mais cinco vezes e após essa etapa foram adicionados anticorpos de captura. Posteriormente foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidina-HRP) e após o período de 30 minutos foi adicionado o substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi então interrompida com ácido sulfúrico 1 N decorrido o tempo de 15 minutos, e a leitura foi realizada em leitor de microplaca a 450 nm.

A curva de concentração padrão de cada citocina foi adicionada à placa (50 µL/cavidade), em duplicata, em seguida adicionou-se as amostras provenientes da cultura celular nos cavidades previamente determinados (50 µL/cavidade). Repetindo-se o tempo de repouso durante uma noite (~ 12 horas) a 4°C.

#### **4.10.5. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram expressos em média ± erro padrão da média e analisados estatisticamente com auxílio do programa de computador (software) GraphPad Prisma versão 5.0. Os dados foram submetidos a análise de variância de um fator (ANOVA one-way), seguido de teste de comparação múltipla de Dunnett. Os testes estatísticos foram escolhidos conforme a natureza dos dados obtidos e descritos nas legendas das figuras.

# *Resultados e Discussão*

---

---

Gomes, A. N. P.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Obtenção das amostras

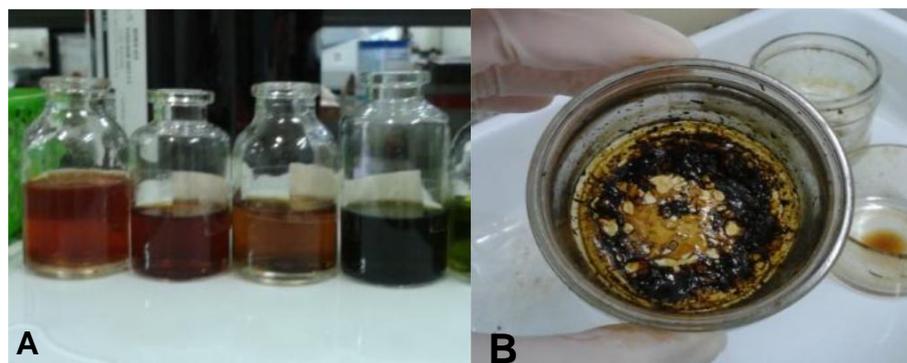
As amostras foram obtidas segundo os itens 4.3 e 4.4 e os rendimentos encontram-se na tabela 1. Por ser extraída de uma fração aquosa, uma maior quantidade da subfração em gramas foi obtida quanto maior foi a polaridade do solvente que eluiu, sendo a subfração eluída com 100% de metanol a de menor rendimento e a subfração eluída com 25% de Metanol a de maior rendimento em massa. A figura 6 mostra a coloração das frações após a extração em fase sólida e o aspecto da fração aquosa liofilizada.

Tabela 1: Rendimento (massa/massa) e quantidade das amostras obtidas nos processos de maceração e extração em fase sólida.

Amostra	Extrato	Fração Aquosa	Subfração 25%	Subfração 50%	Subfração 75%	Subfração 100%
<b>Quantidade (g)</b>	334	200,4	11,98	3,36	1,56	0,6819
<b>Rendimento (%)</b>	17,57	10,54	5,98	2,49	0,78	0,34

O extrato e a fração aquosa foram calculados em função da massa de material vegetal seco e as subfrações expressas em função da massa de fração aquosa liofilizada.

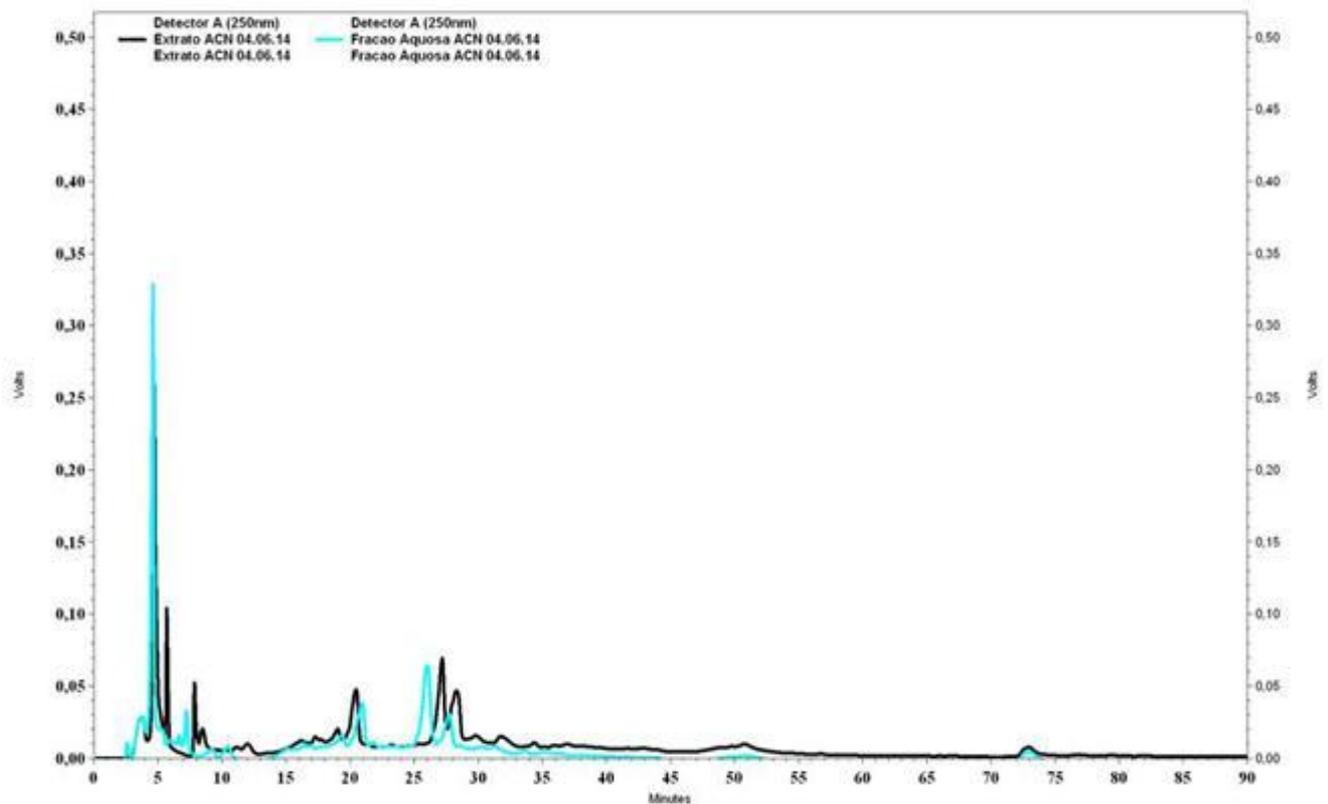
Figura 6: A: Subfrações eluídas em ordem decrescente de polaridade, com 25%, 50%, 75% e 100% de metanol da esquerda para direita. B: Fração aquosa liofilizada.



## 5.2. Perfil Cromatográfico e Análise por RMN

Dentro do aspecto qualitativo, foi realizada uma investigação cromatográfica em CLAE com o objetivo de verificar a polaridade dos constituintes em cada fração analisada após a extração em fase sólida, analisados dentro das mesmas condições cromatográficas.

Figura 7: Perfil cromatográfico do extrato e fração aquosa de *C. sympodialis*, obtido em método gradiente de 5% a 95% de MeOH em 90 min, com fluxo de 1mL/min e  $\lambda = 250$ .

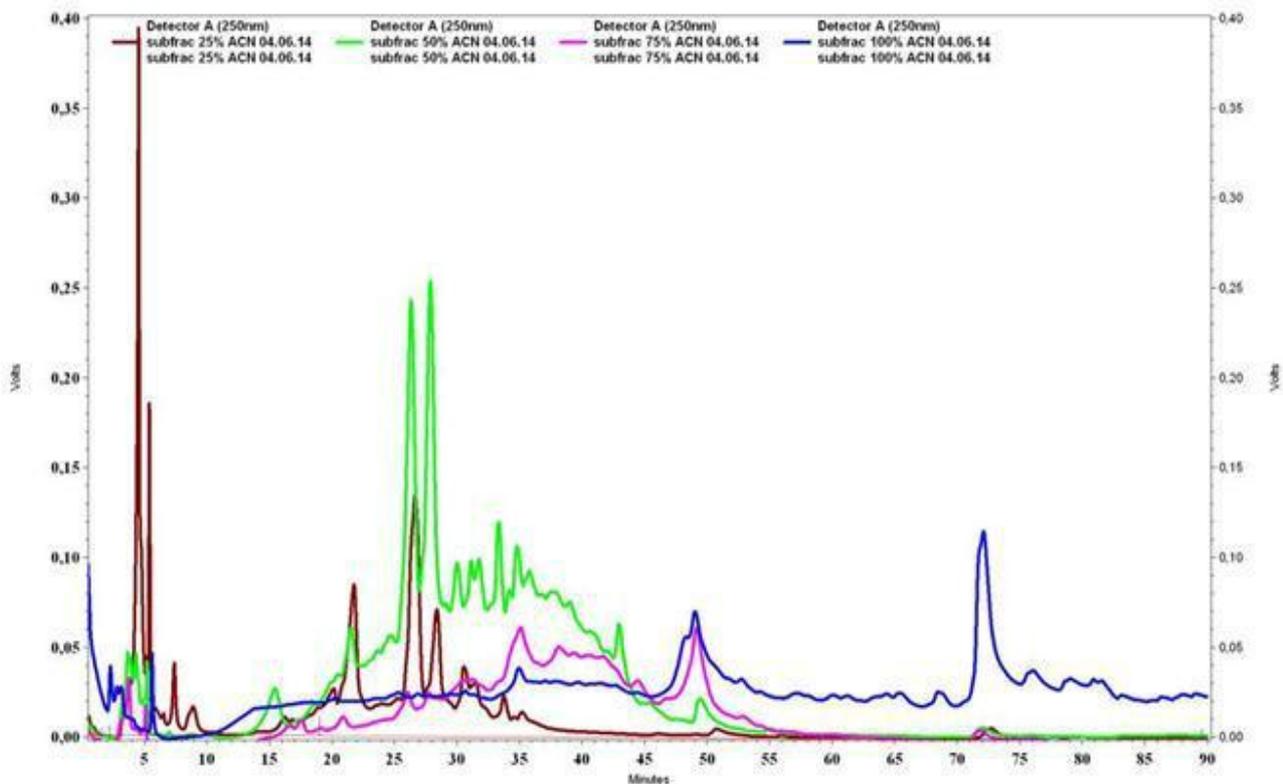


O Extrato e a fração aquosa apresentaram composição química semelhante, isso pode ter ocorrido devido diluição do extrato ter sido feita em metanol e água, provavelmente apenas os compostos mais polares solubilizaram e foram detectados, os mesmos da fração aquosa, deixando o perfil das amostras semelhantes (figura 7). A linha em preto corresponde ao cromatograma do extrato e a azul a fração aquosa.

De forma geral, o perfil cromatográfico de um extrato vegetal e frações pode ser considerado representativo da complexidade química dessa amostra, guardadas as devidas ressalvas em relação ao método específico escolhido, bem como as limitações do detector utilizado. Diversos trabalhos na literatura mencionam o uso deste perfil cromatográfico como um método analítico que pode avaliar a relação entre a informação química e as características de cada amostra vegetal, tais como a diferenciação entre espécies botanicamente semelhantes (PRADO et al., 2012).

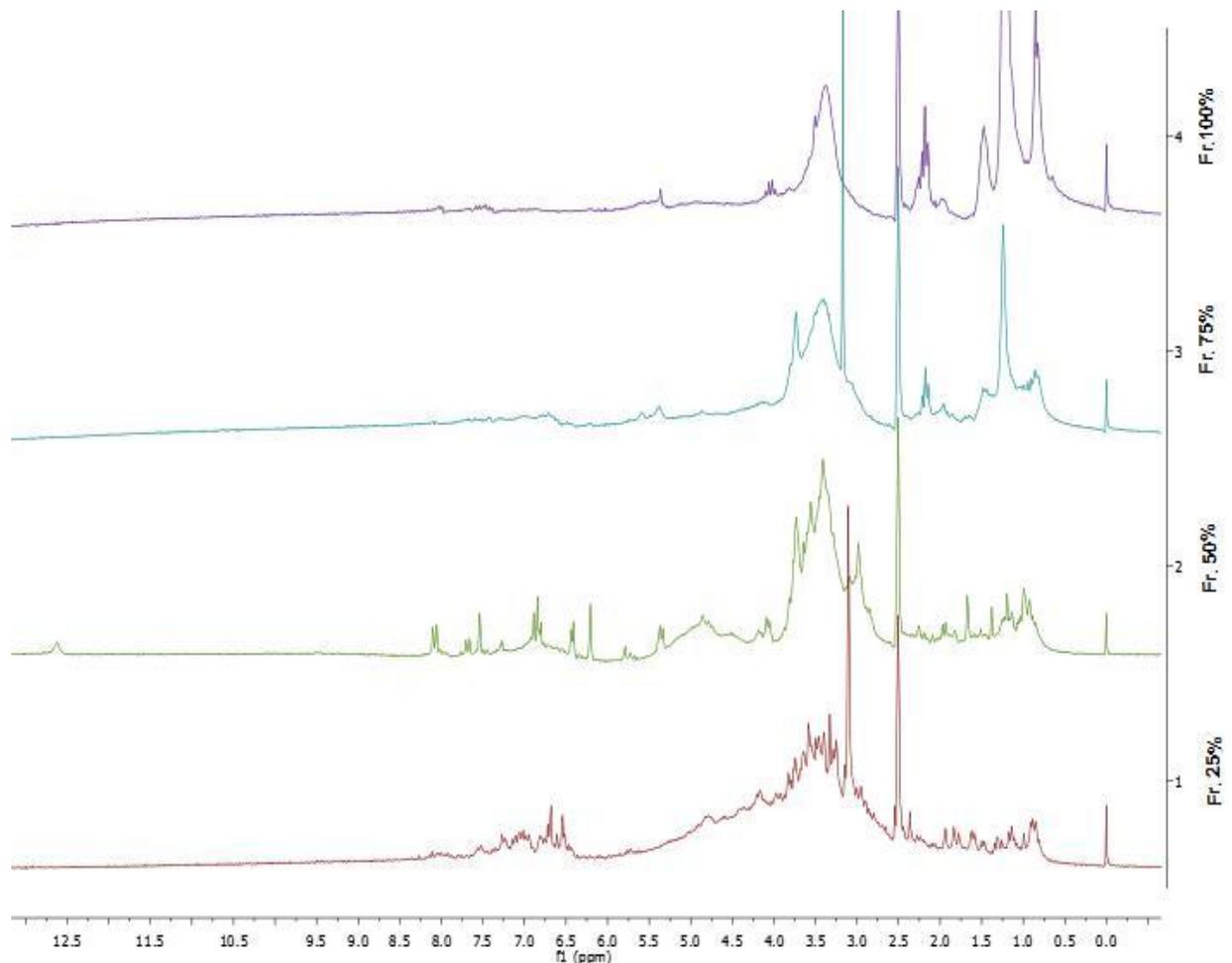
Ao se comparar os cromatogramas das subfrações obtidas após extração em fase sólida, podemos observar que os constituintes encontram-se de acordo com a polaridade do solvente com que foram eluídas, sendo as substâncias mais polares encontradas no início de cromatograma e as menos polares no final, como pode ser visto na figura 8, onde os compostos mais polares encontram-se na fração eluída com 25% (marrom), os de polaridade intermediária nas frações 50% (verde) e 75% (rosa) e de menor polaridade na fração eluída com 100% de metanol (azul).

Figura 8: Perfil cromatográfico das subfrações de *C. sympodialis*, obtido em método gradiente de 5% a 95% de MeOH em 90 min, com fluxo de 1mL/min e  $\lambda = 250$  nm.



No espectro de  $^1\text{H}$  RMN das subfrações dissolvidas em DMSO deuterado (Figura 9) é possível observar que as frações mais polares apresentaram sinais mais intensos na região de anel aromático com deslocamentos entre 5.5 a 8.0 ppm quando comparadas as menos polares, indicando que compostos com essas características químicas se concentraram nessas frações. Na subfração eluída com 50% de metanol também foi observado um sinal na região mais desprotegida do espectro ( $\delta\text{H}$  12,62), que indica a presença de uma hidroxila quelada (SILVA, et al., 2009), esta foi a fração que apresentou sinais mais bem definidos entre as analisadas.

Figura 9: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN das subfrações de *C. sympodialis* obtido em 200 MHz.

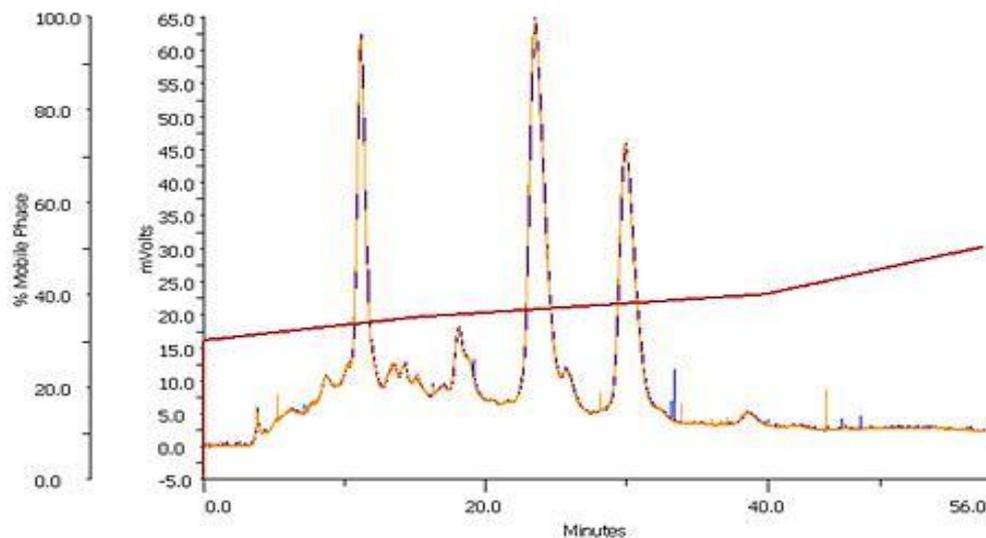


A linha roxa corresponde a fração eluída com 100% de metanol, azul representa a eluída com 75%, linha verde é a fração eluída com 50% e a vermelha com 25% de metanol.

### 5.3. Isolamento do constituinte químico a partir da fração eluída com 50% de metanol.

O método utilizado favoreceu a separação de três substâncias majoritárias, como mostrado na figura 10, as quais foram isoladas e codificadas inicialmente como Cs-1, Cs-2 e Cs-3 e que apresentavam-se como um sólido amorfo amarelo. As substâncias codificadas com Cs-2 e Cs-3 ainda estão em fase de identificação

Figura 10: Separação cromatográfica da subfração eluída com 50% de metanol obtido em método gradiente em 90 min, com fluxo de 4 mL/min e  $\lambda = 250$ .



### 5.4. Determinação estrutural de Cs-1.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 11) de Cs-1 apresentou sinais na região aromática, confirmando o esqueleto de um flavonoide: dois dubletos em  $\delta$  7,9 (2H, H-6'/H-2') e em  $\delta$  6,9 (2H, H-3'/H-5') com  $J = 7,8$  Hz e  $J = 8,0$  Hz respectivamente, evidenciaram que o anel B do núcleo flavonoídico é mono-oxigenado e para-di-substituído. O singleto em  $\delta$  6,3 (1H, H-2) caracteriza uma flavona. (XIE et al, 2003).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 12) apresentou sinais referentes aos carbonos da aglicona e sinais referentes aos açúcares, que foram identificados

como a  $\beta$ -D-glicose (tabela 2). O sinal em  $\delta$  182,4 refere-se à carbonila (C-3) de uma flavona, enquanto que os em  $\delta$  107,5 (C-5) e  $\delta$  105,3 (C-7) mostram que as unidades glicosídicas devem estar ligadas à posição 5 e 7 do anel A (YOSHIZAKI et al., 1987).

Comparação com dados da literatura (YOSHIZAKI et al., 1987; XIE et al., 2003) confirmaram a identificação de Cs-1 como sendo a apigenina-6-C, 8-C-di- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Vicenina-2, figura 13).

Figura 11: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Cs-1 e sua expansão

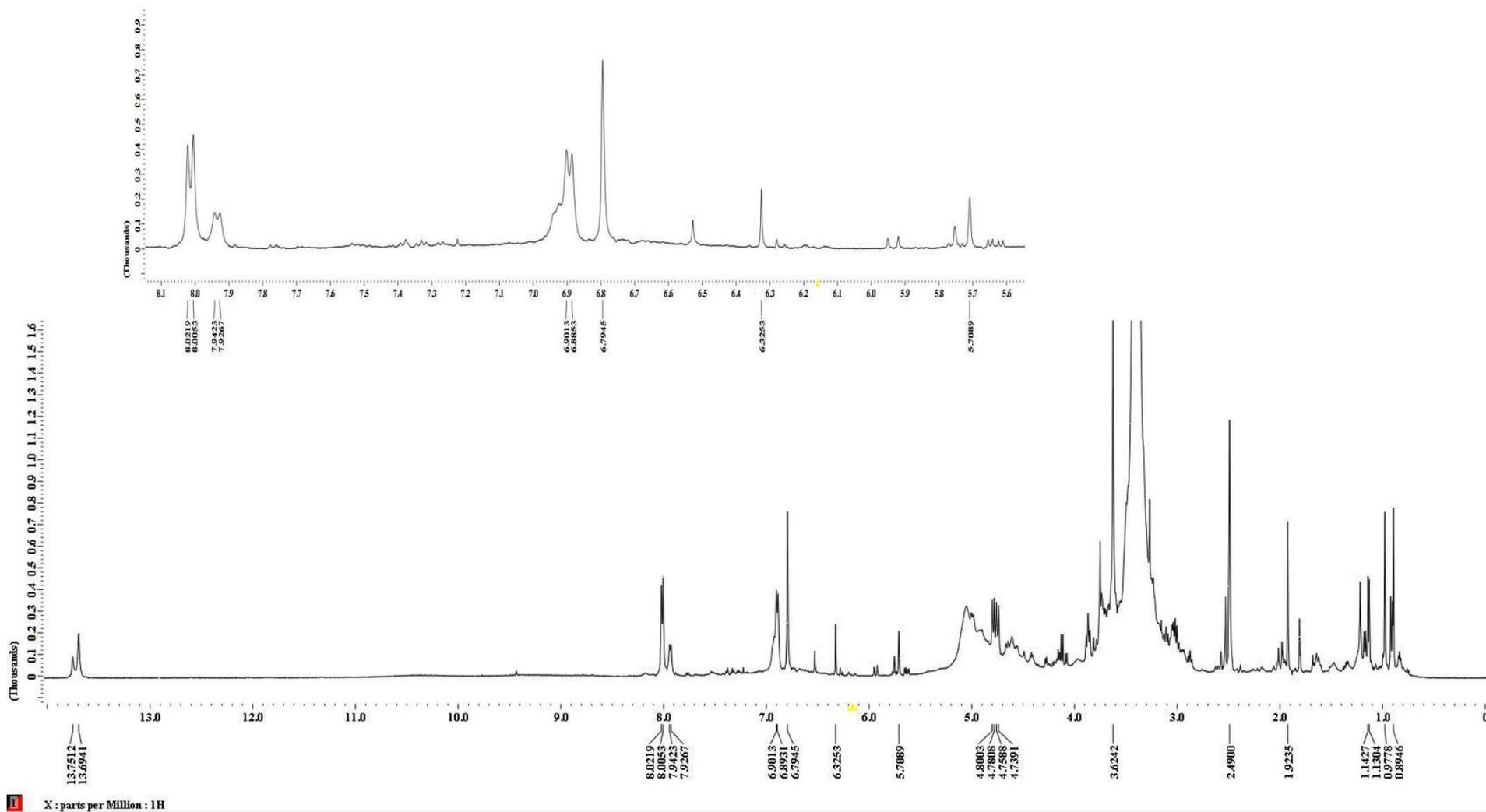
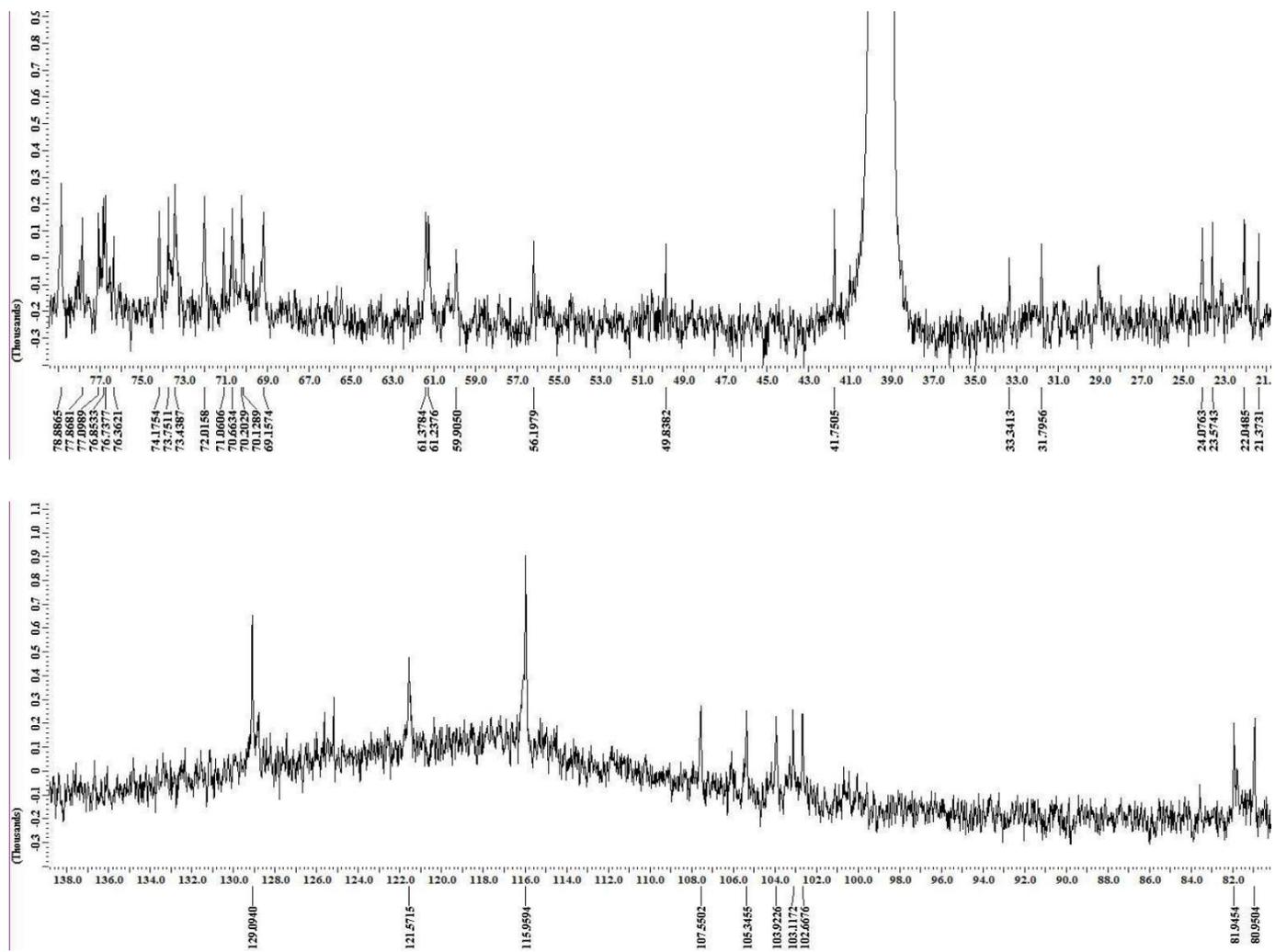


Figura 12: Expansões do espectro de  $^{13}\text{C}$



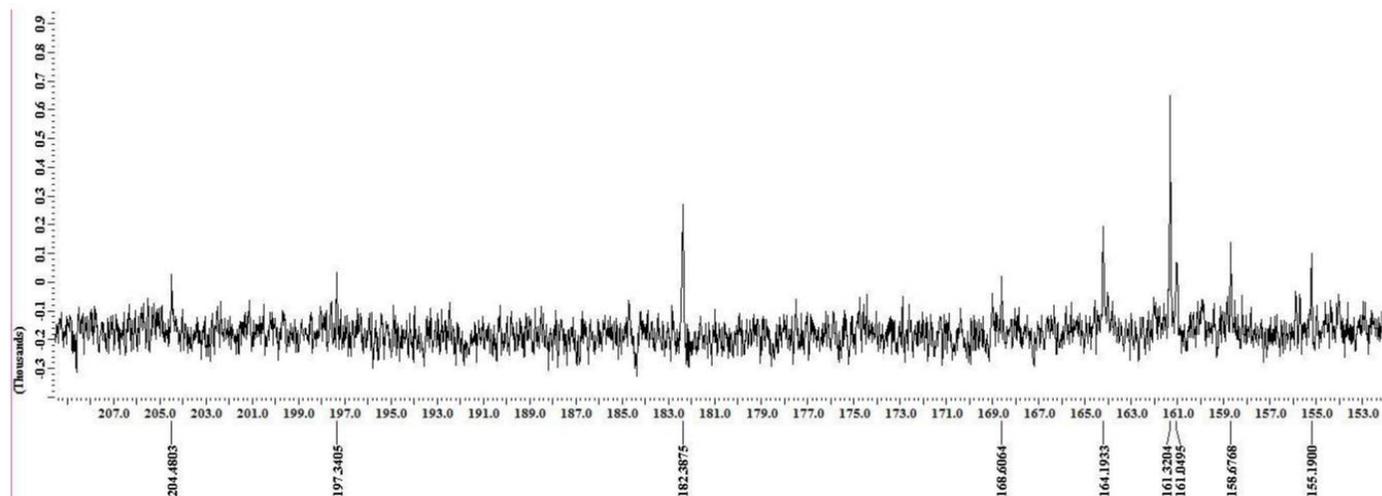


Figura 13: Cs-1: Apigenina-6-C, 8-C-di-β-D-glicopiranosídeo (Vicenina-2)

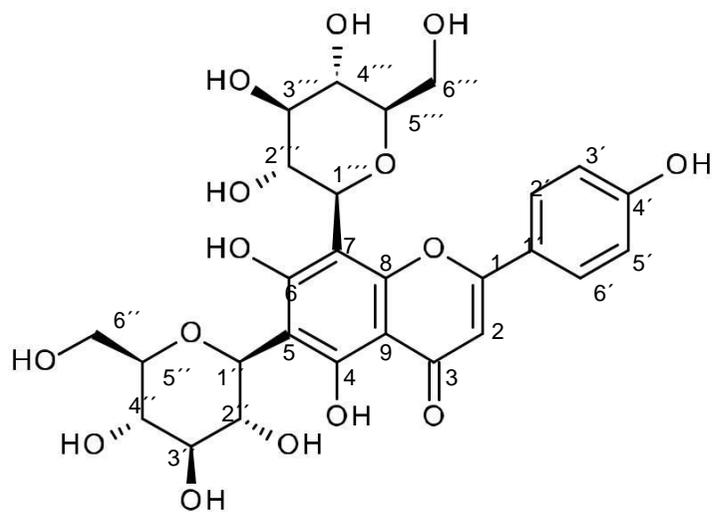


Tabela 2: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Cs-1 (200 e 50 MHz, respectivamente), com dados da literatura.

Número átomo	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm) Experim.	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm) Literatura	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm) Experim.	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm) Literatura
1	164.2	164.3		
2	102.6	102.6	6.3 s	6.4
3	182.4	182.5		
4	161.0	160.8		
4-OH				
5	107.5	107.6		
5-OH			13.7 s	13.7 s
6	161.3	161.3		
7	105.3	105.4		
8	155.2	155.2		
9	103.9	103.9		
1'	121.5	121.6		
2'	129.1	129.1	7.9 d (J=7.8Hz)	7.9
3'	115.9	115.9	6.9 d (J= 8.0Hz)	6.9
4'	158.7	160.9		
5'	115.9	115.9	6.9 d (J=8.0Hz)	6.9
6'	129.1	129.1	7.9 d (J= 7.8Hz)	7.9
1''	73.4	73.3	4.8	4.6
2''	70.7	71.0	4.1	4.1
3''	78.8	77.9		
4''	69.1	69.1		
5''	80.9	80.9		
6''	59.9	59.9		
1'''	73.7	74.1		
2'''	72.0	72.0	3.8	3.8
3'''	78.9	78.9		
4'''	70.2	70.6		
5'''	81.0	81.9		
6'''	61.3	61.3		

\*Phytochemistry, 1987, v.26, p.2557. Dados para 6,8-bis-C-glicopiranosil apigenina.  
Solvente: DMSO-d6

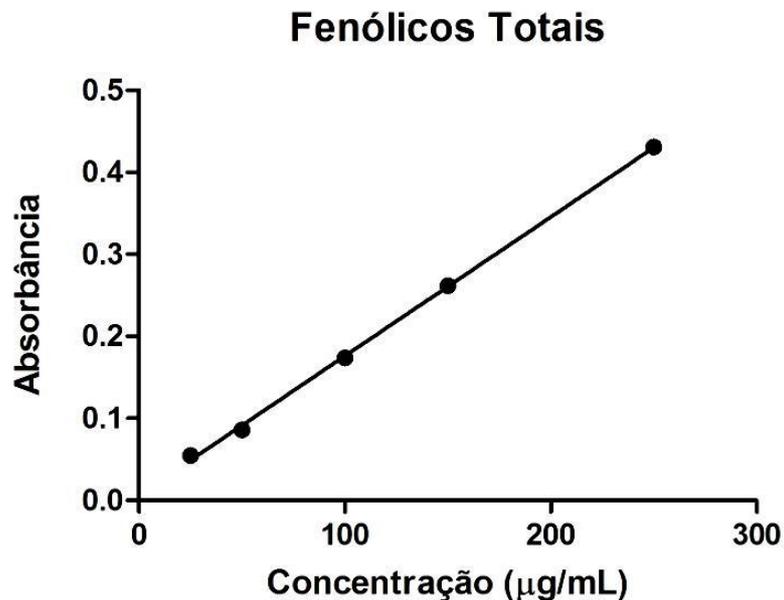
## 5.5. Determinação de Fenólicos e Flavonóis totais

A investigação preliminar dos constituintes químicos de uma planta possibilita um conhecimento prévio do material a ser trabalhado fitoquimicamente, pois indica a natureza das principais substâncias presentes facilitando a escolha de técnicas de fracionamento cromatográfico (GOMES et al., 2011). A espécie *C. sympodialis* é caracterizada fitoquimicamente pela presença de alcaloides (BARBOSA FILHO et al., 1997), além desses constituintes, um estudo realizado por Cavalcanti, et al., (2013), através de *screening* fitoquímico com quatro lotes de folhas de *C. sympodialis*, demonstrou também a presença de compostos fenólicos representados principalmente por taninos e flavonoides no extrato hidroalcoólico das folhas.

A determinação do teor de compostos fenólicos totais se faz muito importante, pois vários estudos têm demonstrado que eles são os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos vegetais, além de apresentar efeito cardioprotetor, atividade antiviral, efeito terapêutico no diabetes experimental, inibição da agregação plaquetária e atividade anti-inflamatória (TIVERON, 2010; TAUBERT et al., 2002; BRUM, 2006; SILVA, 2012; TZENG, et al., 1991; KVIECINSKI, 2007). A quantificação espectrométrica desses compostos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas (SOUSA et al., 2007).

Para determinação do teor de fenólicos totais desenvolveu-se uma curva padrão de ácido gálico, para posterior cálculo das amostras avaliadas. Após a regressão linear, a equação obtida da curva de calibração foi  $Y = 0,0017x + 0,0068$ , onde  $Y$  é a absorbância a 760 nm,  $X$  é a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação ( $R$ ) obtido foi de 0,999 (Figura 14). Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras (concentração  $X$ ), substituindo  $Y$  pela média das absorbâncias de cada amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 14: Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico versus as absorbâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Ciocalteu.



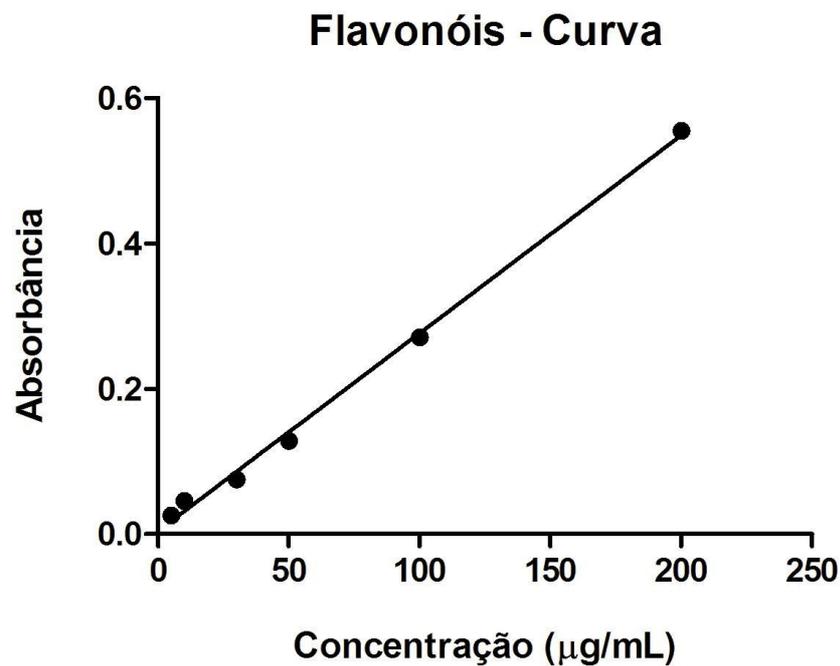
Os compostos fenólicos podem ser agrupados em diferentes categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados hidrolisáveis e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002).

Flavonas e flavonóis são de origem biosintética muito próxima. Os flavonóis são, na verdade, flavonas substituídas na posição C3 por uma hidroxila. Suas análises, sínteses e reações possuem, por isso, base teórica comum (DORNAS et al., 2007).

Para determinação do teor de flavonóis totais também foi obtida uma curva padrão, para este, de quercetina. Após a regressão linear, a equação obtida da curva de calibração foi  $Y=0,0027x+0,0044$ , onde Y é a absorbância a 425 nm e X é a concentração de quercetina. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,997 (Figura 15). Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonóis

totais nas amostras, onde se substituiu  $Y$  pela média da absorbância de cada amostra de própolis. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 15: Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina versus as leituras de absorbâncias (425 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.



A tabela 3 apresenta as concentrações médias  $\pm$  coeficiente de variação de fenólicos e flavonóis totais encontradas no extrato, fração aquosa e subfrações. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA para fazer a análise de variância entre as subfrações e teste t Student quando se comparou o extrato a fração aquosa, obtendo os valores de  $p < 0,0001$ , detectando-se diferença estatística significativa entre as concentrações médias de fenólicos totais nas amostras analisadas. As figuras 16 e 17 mostram os valores expressos em gráfico de barras respectivamente e fenólicos e flavonóis para as amostras analisadas.

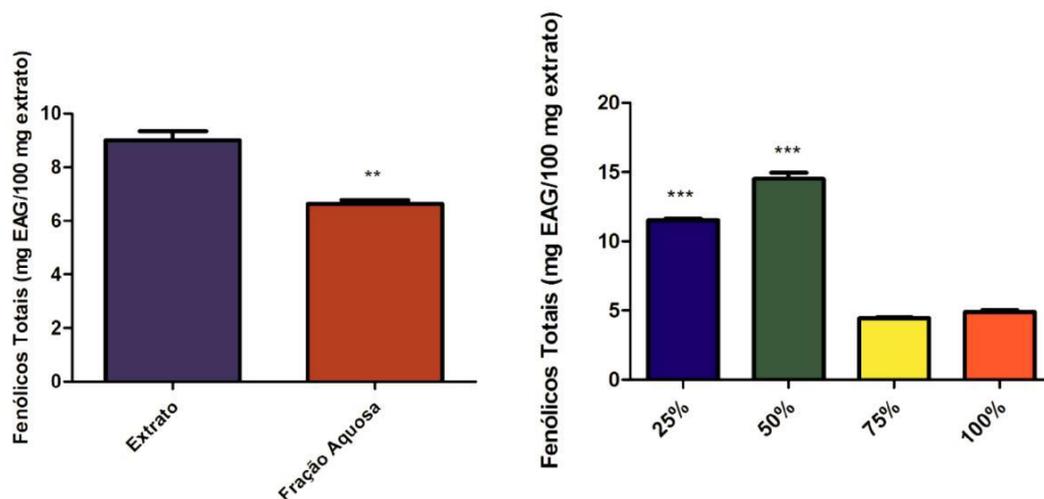
Tabela 3: Concentração média  $\pm$  coeficiente de variação de fenólicos e flavonóis totais encontradas no extrato, fração aquosa e subfrações de *C. sympodialis*.

Amostra	Fenólicos Totais (mgEAG <sup>a</sup> / 100 mg)	Flavonóis Totais (mgEQ <sup>b</sup> / 100 mg)
<b>Extrato</b>	9,01 $\pm$ 5,96	6,48 $\pm$ 6,11
<b>Fração Aquosa</b>	6,64 $\pm$ 3,38	2,17 $\pm$ 3,41
<b>Subfração 25%</b>	11,51 $\pm$ 1,73	2,50 $\pm$ 8,97
<b>Subfração 50%</b>	14,50 $\pm$ 5,25	5,73 $\pm$ 3,56
<b>Subfração 75%</b>	4,42 $\pm$ 2,51	5,32 $\pm$ 2,73
<b>Subfração 100%</b>	4,89 $\pm$ 4,84	4,76 $\pm$ 4,31

<sup>a</sup> Equivalente Ácido gálico

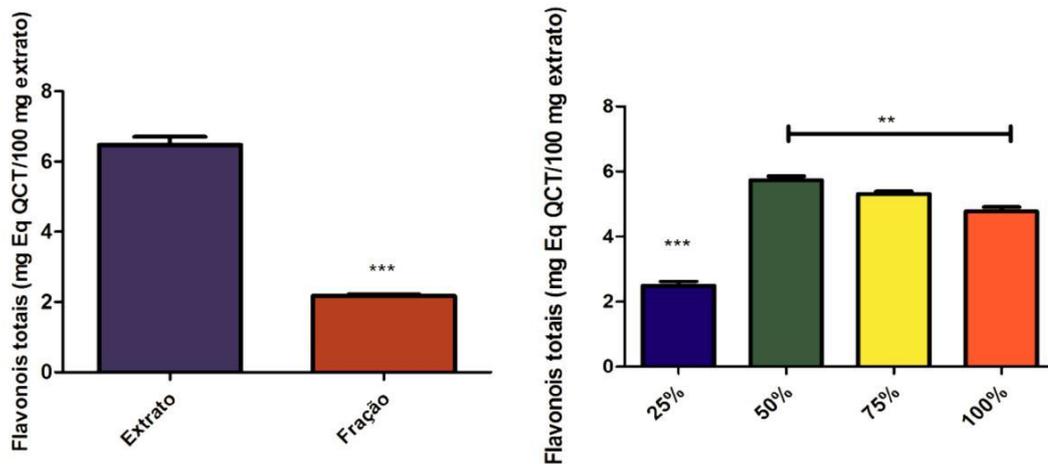
<sup>b</sup> Equivalente Quercetina

Figura 16: Concentração de fenólicos totais expressa em mg equivalente ácido gálico no extrato, fração aquosa e subfrações de *C. sympodialis*.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados através do Software GraphpadPrism através do teste t de Student onde  $**p < 0,01$  (extrato vs fração aquosa), e ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, onde  $***p < 0,001$  foi significativo (25% vs 50%); (25% vs 75%); (25% vs 100%); (50% vs 75%); (50% vs 100%).

Figura 17: Concentração de flavonóis totais expressa em mg equivalente quercetina no extrato, fração aquosa e subfrações de *C. sympodialis*.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados através do Software GraphpadPrism através do teste t de Student onde  $***p < 0,001$  (extrato vs fração aquosa), e ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, onde  $***p < 0,001$  (25% vs 50%); (25% vs 75%); (25% vs 100%);  $**p < 0,01$  (50% vs 100%).

De acordo com a quantificação, as amostras exibiram concentrações de fenólicos e flavonóis totais semelhantes, tendo a Subfração 50% um maior teor de compostos fenólicos e o extrato maior teor de flavonóis. Evidencia-se, portanto, que uma mistura de diferentes compostos fenólicos, com polaridade diversificada, encontra-se nas subfrações, sendo a maior proporção destes constituintes solúvel em água.

Os teores de flavonóis encontrados foram geralmente superiores aos relatados por autores que estudaram outras espécies do gênero *Cissampelos*. Thukham-mee e Wattanathorn (2012), trabalhando com extrato hidroalcoólico de *C. parreira* relataram valores de fenólicos totais de 404.56 mg EAG/ 100 g de extrato que equivale a 0,404 mg EAG/ 100 mg de extrato. Thavamani, Mathew e Dhanabal (2014), em estudos com o extrato aquoso de *C. parreira* mostraram que o mesmo apresentava um teor de 20.1 mg EAG/ g de extrato, o equivalente a 2.01 mg EAG/100 mg de extrato, confirmando que a uma maior quantidade desses compostos são encontrados em amostras solúveis em água.

## 5.6. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

### 5.6.1. Atividade sequestradora do radical DPPH

Um dos métodos mais usados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH<sup>•</sup>, que absorve radiação a 515 nm (SOUSA et al., 2007). Este método consiste na redução do radical DPPH<sup>•</sup>, de coloração púrpura, que, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, muda sua coloração para amarelo (difenil-picril-hidrazina), ficando estável e com o desaparecimento da absorção que pode ser avaliada pelo decréscimo da absorbância (COSTA et al., 2010).

Com a finalidade de avaliar a capacidade dos constituintes do extrato, fração aquosa e subfrações de *C. sympodialis* em capturar radicais livres, foi feita análise de soluções destes com DPPH. Os resultados foram expressos em CE<sub>50</sub>, ou seja, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA). Na Tabela 4 encontram-se as concentrações de CE<sub>50</sub> para cada uma das amostras analisadas e o controle positivo (Ácido ascórbico).

Tabela 4: Atividade sequestradora de radical DPPH das amostras e Ácido ascórbico.

<b>Amostra</b>	<b>CE<sub>50</sub> ± DP (µg/mL)</b>
<b>Extrato</b>	27,10 ± 0,21
<b>Fr. Aquosa</b>	9,98 ± 1,22
<b>Subfração 25%</b>	15,09 ± 0,14
<b>Subfração 50%</b>	20,45 ± 1,08
<b>Subfração 75%</b>	39,24 ± 0,47
<b>Subfração 100%</b>	154,85 ± 1,82
<b>Ácido Ascórbico</b>	4,25 ± 0,22

CE<sub>50</sub>: Concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o radical DP: Desvio Padrão

Como observado na Tabela 4, a fração aquosa apresentou uma menor concentração de CE<sub>50</sub> (9,98 ± 1,22 µg/mL) quando comparada as outras amostras estudadas, e a Subfração eluída com 100% de metanol apresentou a maior CE<sub>50</sub> (154,85 ± 1,82 µg/mL). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007). Observou-se uma correlação negativa entre os fenólicos totais e a CE<sub>50</sub> obtida pelo método que usou DPPH como radical, conforme mostrado na figura 18, onde foi encontrado um R = - 0,5086, que segundo Dancey e Reidy (2006) é considerado uma correlação moderada, no entanto esta correlação não apresentou p<0,05, ou seja não foi significativa. O sinal negativo significa que estas variáveis são inversamente proporcionais, isto é, ao se aumentar a quantidade de fenólicos totais nas amostras ocorre uma diminuição da CE<sub>50</sub>, o que mostra que esses compostos de fato estão envolvidos com a resposta antioxidante nas amostras. A figura 19 mostra o gráfico de barras para as amostras analisadas e o ácido ascórbico como controle positivo.

Figura 18: Correlação entre Fenólicos totais das seis amostras analisadas e a CE50. Obtida pelo método com DPPH como radical.

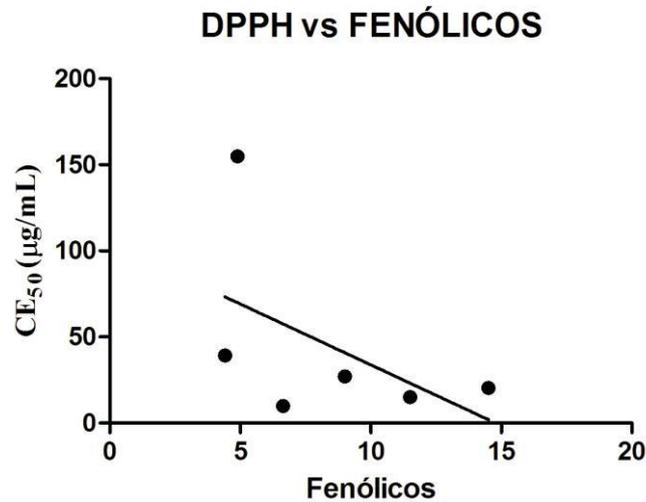
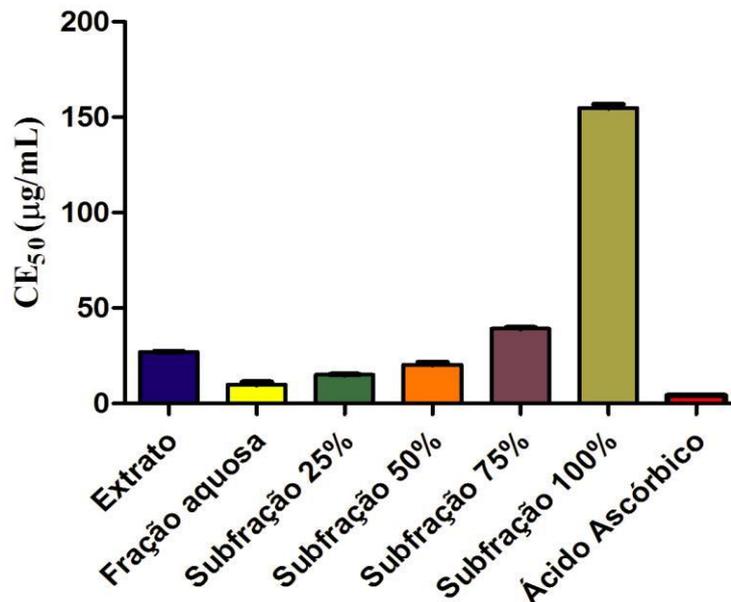


Figura 19: CE50 expressa em µg/mL do extrato, fração aquosa, subfrações de *C. sympodialis* e Ácido Ascórbico.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados através do Software GraphpadPrism através de ANOVA One-Way seguido do pós-teste de Tukey, onde \* $p < 0,05$  foi significativo (Subfrac. 25% vs Fração aquosa e subfrac. 50%); (Fração aquosa e A. ascórbico) e \*\*\* $p < 0,001$  foi significativo para as demais comparações.

### 5.6.2. Atividade antioxidante pelo método ABTS

Assim como o teste de DPPH, o de ABTS tem como objetivo avaliar a capacidade das amostras em capturar os radicais livres, neste teste o ABTS. Os resultados foram expressos em termos de  $CE_{50}$ . Na Tabela 5 encontram-se as concentrações de  $CE_{50}$  para cada uma das amostras analisadas e o controle positivo (Trolox).

Como observado na Tabela 5, a amostra Subfração 25%,  $CE_{50} = 13,54 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ , apresentou uma melhor atividade sequestradora do radical ABTS e a amostra Subfração 100%,  $CE_{50} = 133,87 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$ , foi a menos ativa, resultados semelhantes aos observados no teste com DPPH, isto é, a medida que se aumenta a hidrofobicidade das frações, ocorre uma diminuição da atividade antioxidante das mesmas. O Trolox (controle positivo) apresentou  $CE_{50} = 3,83 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ .

Tabela 5: Atividade sequestradora de radical ABTS das amostras e trolox.

<b>Amostra</b>	<b><math>CE_{50} \pm DP (\mu\text{g/mL})</math></b>
<b>Extrato</b>	$26,50 \pm 0,24$
<b>Fr. Aquosa</b>	$26,62 \pm 0,32$
<b>Subfração 25%</b>	$13,54 \pm 0,13$
<b>Subfração 50%</b>	$19,99 \pm 0,06$
<b>Subfração 75%</b>	$25,78 \pm 0,58$
<b>Subfração 100%</b>	$133,87 \pm 0,68$
<b>Trolox</b>	$3,83 \pm 0,05$

$CE_{50}$ : Concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o radical DP: Desvio Padrão

Assim como método DPPH, observou-se uma correlação negativa entre os fenólicos totais e a  $CE_{50}$ , conforme mostrado na figura 20, onde foi encontrado um  $R = -0,5103$ , considerado uma correlação moderada, no entanto também não se apresentou significativo. A figura 21 mostra os valores expressos em gráfico de barras para as amostras analisadas.

Figura 20: Correlação entre Fenólicos totais das seis amostras analisadas e a  $CE_{50}$  obtida pelo método com DPPH como radical.

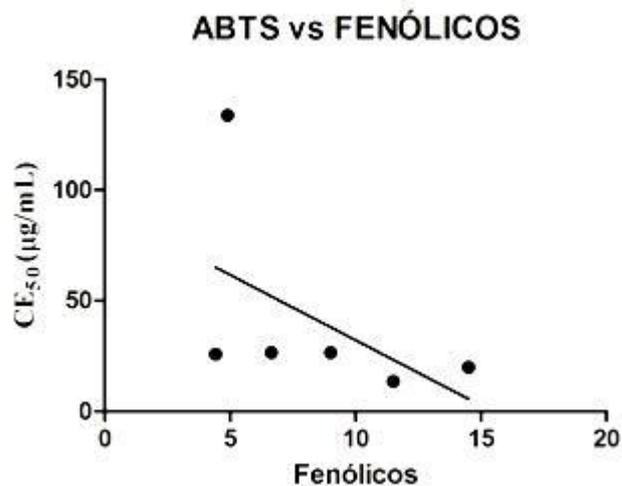
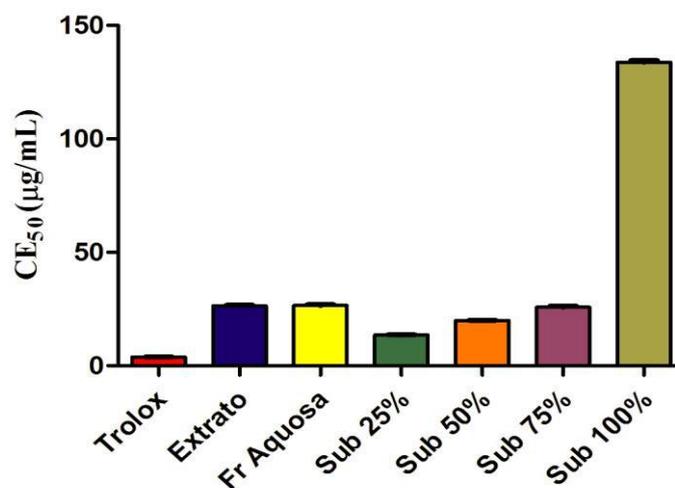


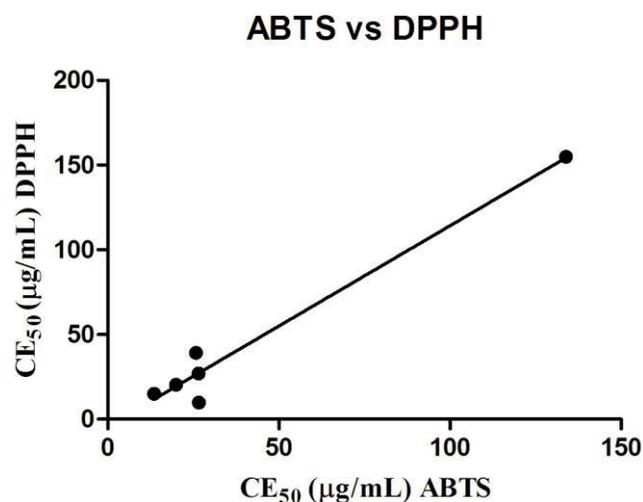
Figura 21:  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{g/mL}$  do extrato, fração aquosa, subfrações de *C. sympodialis* e Trolox.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados através do Software GraphpadPrism através de ANOVA One-Way seguido do pós-teste de Tukey, onde  $***p < 0,0001$  foi significativo para todas as comparações exceto (Extrato vs Fração aquosa e Subfrac 75%); (Fração aquosa vs Subfrac. 75%).

Ao se comparar as duas metodologias utilizadas para determinar a atividade antioxidante, podemos perceber que a mesma amostra não apresentou melhor atividade nos dois ensaios, embora a Subfração 25% tenha sido a melhor pelo teste de ABTS a mesma não foi a melhor pelo método de DPPH, apesar de ter apresentado concentração semelhante nos dois testes, a amostra que demonstrou melhor atividade pelo método de DPPH foi a fração aquosa. Possíveis explicações para tal fato são: os princípios dos métodos, os reagentes, as diferentes características e mecanismo de ação dos compostos bioativos das amostras, possíveis erros de análise (MELO et al., 2006). Ao analisarem a atividade antioxidante de frutos em dois ensaios (DPPH e ABTS), Floegel, et al. (2011), encontraram maior atividade do blueberry no sequestro do radical ABTS enquanto o morango exibiu maior atividade pelo método de DPPH. Ainda assim, ao estudar a concordância entre os dois métodos pelo coeficiente de Pearson, é possível observar que há uma correlação forte entre eles, com  $R = 0,9840$ , e  $p < 0,001$ , ou seja, a correlação foi significativa, indicando que embora os resultados não tenham sido iguais, os dois métodos apontam da mesma forma para as amostras que possuem maior atividade antioxidante, como demonstra a figura 22. Isto demonstra que os constituintes mais polares são os mais envolvidos com a atividade antioxidante.

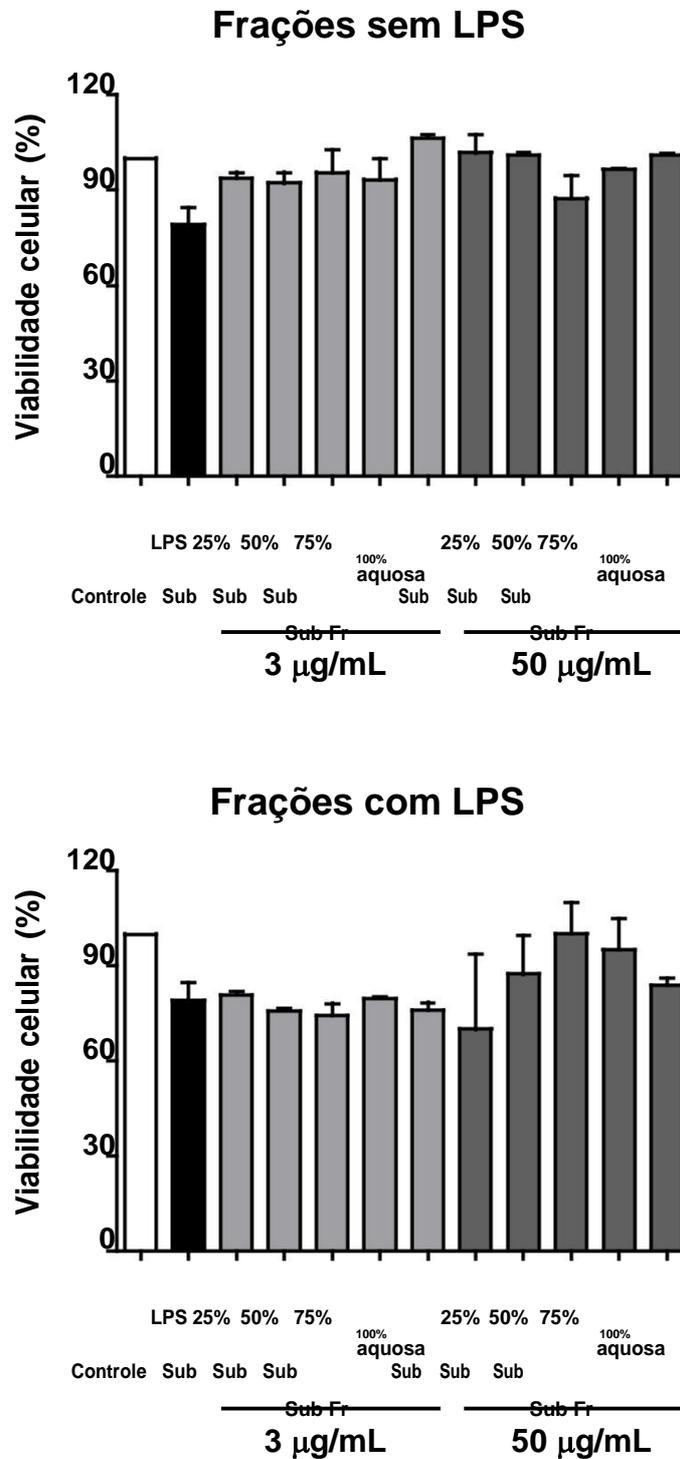
Figura 22: Correlação entre a  $CE_{50}$  obtida pelo método com DPPH e ABTS como radical.



## 5.7. Viabilidade Celular e dosagem de Óxido Nítrico

O ensaio de MTT analisa quantitativamente a redução do sal de tetrazolium (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente nas células, com a formação de um produto final de cristais de formazan que são mensurados em espectrofotômetro a 570 nm. Esse ensaio é usado para a funcionalidade celular e mitocondrial e avalia a toxicidade do material através da viabilidade celular (GOES, et al., 2012). Os resultados do ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT, avaliado 24 horas após o tratamento com a fração aquosa de *C. sympodialis* e as subfrações (3 e 50 µg/mL) demonstraram que não houve diminuição significativa nas porcentagens de sobrevivência, o que indica que as amostras não apresentam toxicidade às células nessas concentrações (Figura 23). Esses resultados corroboram com estudo anterior onde a viabilidade celular foi avaliada utilizando as mesmas concentrações da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis* em cultura de macrófagos e linfonodos mesentéricos (CAVALCANTI, 2013), e não foi observada redução significativa da mesma.

Figura 23: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos tratados por 24h com as subfrações (3 e 50 µg/mL) e a fração aquosa do extrato etanólico de *Cissampelos sympodialis* Eichl.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, de 2 animais. ANOVA *one-way* seguido por Dunnet.

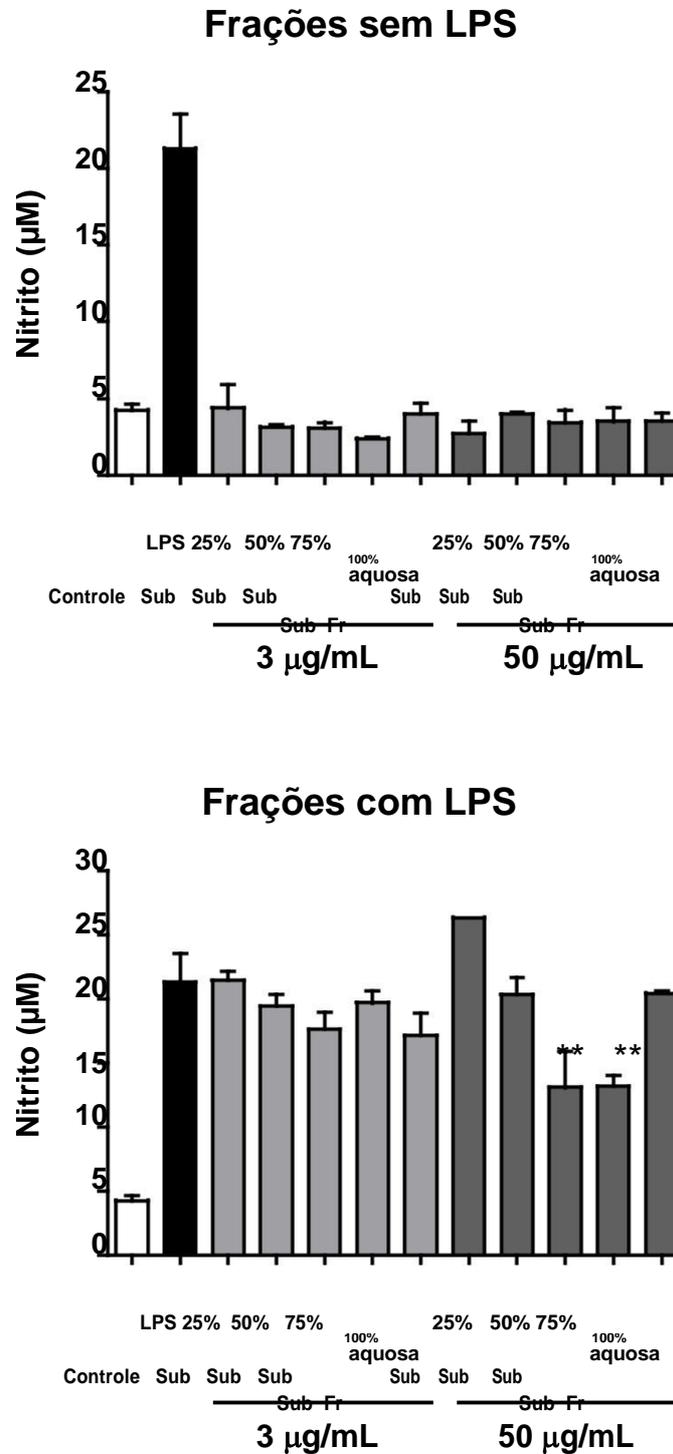
O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização que desempenha um papel chave na inflamação, e está envolvido na patogênese de doenças inflamatórias das articulações, pulmões e intestinos. Novas drogas capazes de reduzir a concentração de NO representam importante avanço terapêutico no tratamento dessas doenças (SHARMA et al., 2007).

O NO é um radical livre inalterado que é produzido durante a conversão enzimática da L-arginina para L-citrulina por membros da família de proteínas óxido nítrico sintase (NOS), que se decompõem rapidamente em nitrito e nitrato. O nitrito é um metabólito final da oxidação do NO, e por ser um produto estável é quantificado com maior facilidade que o NO, e assim tem sido frequentemente usado nas pesquisas como marcador da inflamação (LEITÃO et al., 2005). Por esse motivo a produção do óxido nítrico (NO) pelos macrófagos foi avaliada pela quantificação do nitrito no sobrenadante das culturas por meio da reação de Griess.

Não houve diferença estatística entre a produção basal do NO pelos macrófagos peritoneais quando comparados ao controle (Figura 24). As frações 3 e 4 (eluídas com 75% e 100% de metanol respectivamente) na concentração de 50 µg/mL promoveram uma redução estatisticamente significativa na concentração de nitrito quando comparado aos níveis induzidos pelo LPS sozinho, o que demonstra que essas frações possuem atividade anti-inflamatória, conforme já relatado em estudos anteriores (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003) e dado o papel do NO na inflamação.

Kondo, Takano e Hojo (1993), estudaram o efeito supressor de cinco alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, frequente em plantas da família Menispermaceae, sobre a produção de NO em cultura de macrófagos, e observaram que todos reduziram significativamente a produção de NO na concentração de 5 µg/mL, e que a supressão persistiu por 48 horas.

Figura 24: Efeito das subfrações (3 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e da fração aquosa do extrato etanólico de *Cissampelos sympodialis* Eichl. sobre a produção de NO em macrófagos peritoneais murinos após estímulo com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) in vitro.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, de 2 animais. ANOVA *one-way* seguido por Dunnet. \*\*\* $p < 0,001$  (LPS vs controle); \*\* $p < 0,01$  (LPS vs grupos tratados).

Napolitano et al. (2005), ao avaliar extratos vegetais de plantas do cerrado Brasileiro, sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos de camundongos, encontraram que os extratos de *Serjania lethalis* e *Cupania vernalis* reduziram mais efetivamente a produção de NO comparado a outros extratos testados, além de salientar que essas espécies já são utilizadas pela medicina tradicional como agente anti-inflamatório. Azadmehr, et al. (2009), estudaram o efeito do extrato de *Scrophularia striata*, também tradicionalmente usada em desordens inflamatórias, sobre a produção de NO em macrófagos induzidos por LPS e relataram a diminuição na produção de NO (10, 50 e 100 µg/mL) como um dos mecanismos responsáveis pela atividade anti-inflamatória atribuída.

## 5.8. Dosagem de citocinas - TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$

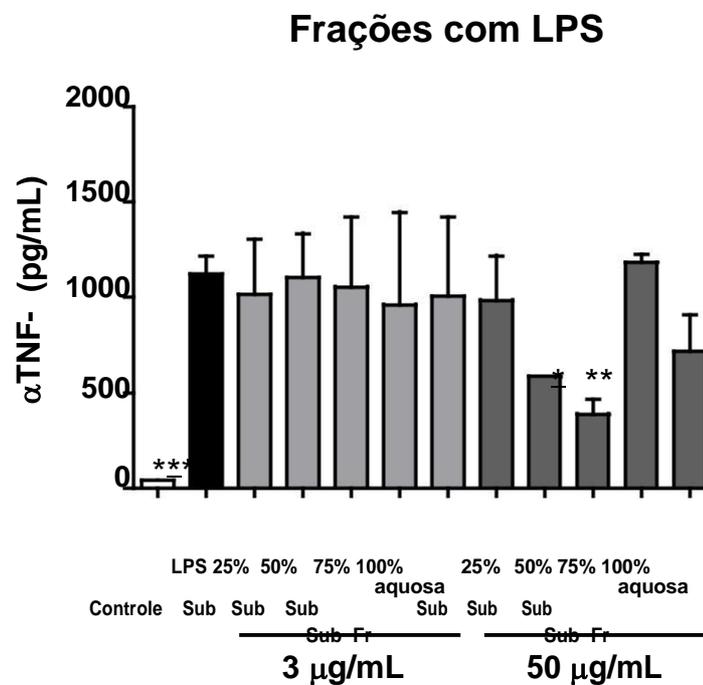
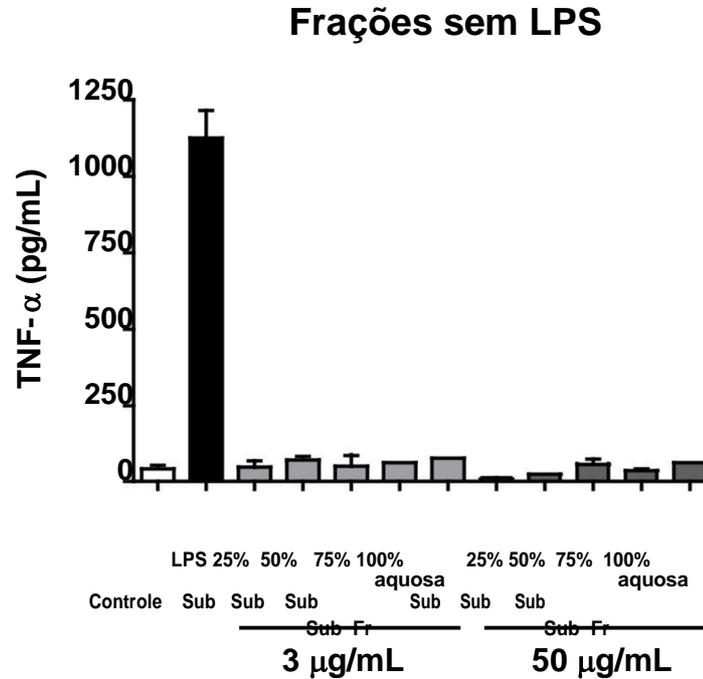
Entre as células inflamatórias, os macrófagos são amplamente reconhecidos como células de grande importância na secreção de citocinas, estas desempenham importante função na indução e mediação de respostas inflamatórias e imunológicas (CLEMER, 2010).

O ensaio induzido por LPS da parede de bactérias Gram negativas é um modelo experimental útil para identificar moléculas anti-inflamatórias associadas à regulação de citocinas pró-inflamatórias, isso se deve a ligação do LPS a receptores presentes na membrana das células que produzem e liberam citocinas tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas citocinas induzem a produção/liberação de outras citocinas e quimiocinas, expressão de moléculas de adesão, angiogênese e mediam efeitos inflamatórios sistêmicos, como a febre, a hipotensão além de promoverem a neutrofilia (TINCANI et al., 2007).

Na figura 25 é possível observar que ao avaliar o TNF- $\alpha$  na ausência de LPS, os níveis basais do mesmo se apresentam semelhantes aos níveis do controle. No entanto, na presença de LPS, há um significativo aumento na concentração de TNF- $\alpha$ . As frações 2 e 3 (Eluídas respectivamente com 50% e 75% de metanol) na

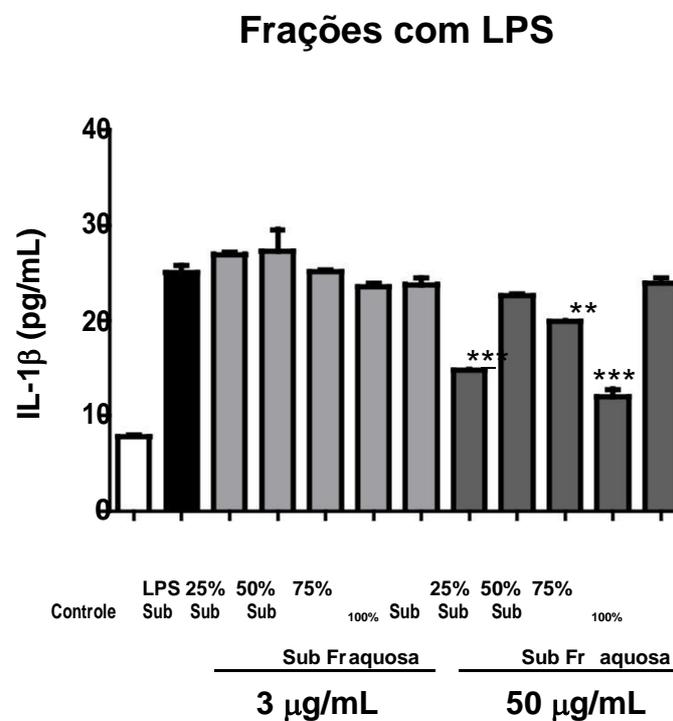
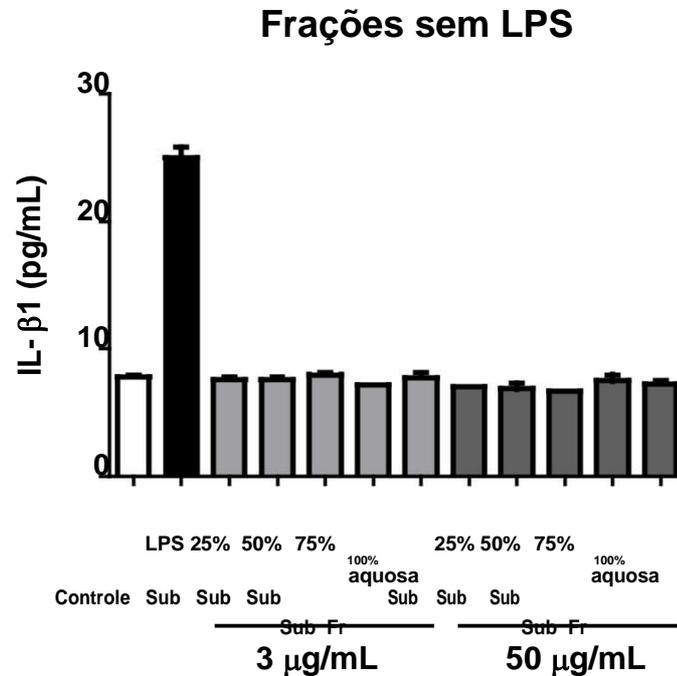
concentração de 50 µg/mL promoveram uma redução estatisticamente significativa na concentração de TNF-α. Cavalcanti (2013) estudou o efeito da fração aquosa do extrato de *C. sympodialis* (3, 12 e 50 µg/mL) sobre TNF-α e observou que houve redução significativa da citocina para ambas as concentrações e sem diferença estatística entre elas, corroborando a atividade anti-inflamatória da fração. Na figura 26, de acordo com os resultados obtidos, as amostras 1, 3 e 4 testadas na concentração 50 µg/mL conseguiram reduzir de forma significativa a concentração de IL-1β quando comparadas ao LPS.

Figura 25: Efeito das subfrações (3 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e da fração aquosa do extrato etanólico de *Cissampelos sympodialis* Eichl. sobre a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais murinos após estímulo com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) in vitro.



Gráficos representativos de 3 experimentos independentes. ANOVA *one-way* seguido por Dunnet.  
 \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  (LPS vs grupos tratados).

Figura 26: Efeito das subfrações (3 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e da fração aquosa do extrato etanólico de *Cissampelos sympodialis* Eichl. sobre a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos peritoneais murinos após estímulo com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) in vitro.



Gráficos representativos de 3 experimentos independentes. ANOVA *one-way* seguido por Dunnet. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  (LPS vs grupos tratados).

Dentre essas vias de sinalização, a via do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) é uma das mais importantes na síntese de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , bem como para a expressão da sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) responsável pela produção de NO em grandes concentrações durante os processos inflamatórios (DIAMANT; DIKSTEIN, 2013).

Kudo et al. (2011), estudando um alcaloide isolado da espécie *Stephania cepharantha* (Menispermaceae) em modelo murino de inflamação sistêmica induzida por LPS demonstrou que o alcaloide foi capaz de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após 24 horas. Além disso, utilizaram macrófagos para caracterizar os efeitos sobre a regulamentação NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B é conhecida como uma proteína nuclear crítica para controlar a expressão de fatores associados com a inflamação. Normalmente, o NF- $\kappa$ B é ligado ao seu inibidor, I $\kappa$ B. No entanto, quando I $\kappa$ B é fosforilada, a NF- $\kappa$ B torna-se ativada, e após a translocação para o núcleo, induz a expressão de várias proteínas pró-inflamatórias. Os autores demonstraram que o alcaloide bloqueou a fosforilação de I $\kappa$ B induzida por LPS e, como resultado, inibiu a ativação de NF- $\kappa$ B, presumindo que este era o mecanismo pelo qual reduziu as citocinas e secreção NO após o tratamento LPS.

Outro estudo que vai de encontro com os resultados encontrados acima é o de Cheong et al., (2011) que demonstraram que o extrato aquoso da *Polygala tenuifolia* foi capaz de reduzir a liberação dos mediadores inflamatórios em células isoladas da micróglia, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , NO e PGE2, e atribuíram esse efeito a prevenção da ativação do NF- $\kappa$ B e inibição da degradação do I $\kappa$ B.

Também em estudo semelhante, Kim et al. (2013) mostraram que a fração aquosa de *Diospyros kaki*, fonte de compostos polifenólicos como a *C. sympodialis*, mostrou reduzir a expressão gênica e a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , assim como redução da atividade do NF- $\kappa$ B em um modelo de inflamação alérgica induzida em camundongos. Atualmente, muitos compostos fenólicos já isolados das plantas e bem conhecidos como, resveratrol, cumarinas e quercetina possuem efeito anti-inflamatório por meio de regulação negativa da via de sinalização de NF- $\kappa$ B em macrófagos (NAHAR et al., 2014).

# *Conclusão*

---

---

## 6. CONCLUSÃO

Considerando que o estudo químico da fração aquosa nunca havia sido realizado, os resultados aqui expostos representam um avanço, visto que os estudos químicos até o momento haviam se concentrado no extrato etanólico das folhas e raízes de *C. sympodialis*;

O maior teor de compostos fenólicos totais foi encontrado nas frações mais polares (eluídas com 25 % e 50% de Metanol), apresentando apenas uma pequena quantidade de flavonóis totais. Em contrapartida foi encontrado um menor teor de compostos fenólicos nas frações de menor polaridade (eluídas com 75% e 100% de Metanol), com quase o mesmo teor de flavonóis totais;

Entre as subfrações estudadas a que apresentou melhor atividade antioxidante foi a eluída com 25% de Metanol, dentre elas a mais polar, a qual apresentou maior capacidade de sequestrar os radicais DPPH e ABTS. Isto sugere que compostos polares, como fenólicos totais sejam os responsáveis por esta atividade;

Os dois métodos que estudaram atividade antioxidante, apresentaram uma forte correlação, isto é, apontam da mesma forma para as amostras que possuem maior atividade antioxidante, mostrando que os mesmos compostos estão envolvidos na atividade antioxidante dos dois métodos;

As amostras estudadas nas duas concentrações não apresentaram toxicidade às células. A fração eluída com 75% de Metanol foi a única que reduziu de forma significativa os níveis de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sendo considerada como a fração que apresentou melhor atividade anti-inflamatória.

Este trabalho confirma a ação anti-inflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis*, e aponta para o papel de substâncias polares, possivelmente fenólicos e flavonoides como responsáveis pela ação anti-inflamatória observada para esta fração.

# *Perspectivas*

---

## **7. PERSPECTIVAS**

- 7.1.** Isolar os constituintes majoritários das frações ativas e caracterizar a estrutura química através de técnicas espectroscópicas convencionais;
- 7.2.** Submeter as substâncias isoladas a bioensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação dos níveis celulares de citocinas, a fim de verificar se a atividade está relacionada a apenas uma ou ao conjunto de substâncias;
- 7.3.** Quantificar os marcadores atuais, warifteína e metilwarifteína, no extrato fração aquosa e subfrações.

# *Referências*

---

---

## 8. REFERÊNCIAS.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Brasil: Elsevier, 2003.

AGRA, M. F.; FREITAS, F. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. FREIRE-DE-LIMA, C. G.; TRINDADE, M. N.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10- dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. **Brazilian jornal of medical and biological research**, v. 36, p. 199-205, 2003.

ALVES A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem**, v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.

ALVES, N. D. da C.; SANTOS, T. C.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; LIRA, M. L.; DORNELAS, C. B.; CABRAL, L. M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 745-753, 2008.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.

ALVES, N. D. da C.; SANTOS, T. C.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; LIRA, M. L.; DORNELAS, C. B.; CABRAL, L. M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e officinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p.745-753, 2008.

ARUMUGAM, R.; RAGUPATHI, R. K. R.; JAYALAKSHMI, J.; MANIVANNAN, K.; KARTHIKAI, D. G.; ANANTHARAMAN, P. Determination of element contents in herbal drugs: Chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2372-2377, 2012.

AZADMEHR, A.; AFSHARI, A.; BARADARAN, B.; HAJIAGHAEI, R.; REZAZADEH, S.; MONSEF-ESDAHANI, H. Suppression of nitric oxide production in activated murine peritoneal macrophages in vitro and ex vivo by *Scrophularia striata* ethanolic extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, p. 166-169, 2009.

BACHIEGA, T. F.; ORSATTI, C. L.; PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M. The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages. **Phytotherapy Research**, v.26, p.1308 – 1313, 2012.

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil).

**Journal Braz Assoc Advanc Sci**, v. 49, p. 386-394, 1997.

BATISTA-LIMA, K. V.; RIBEIRO R. A.; BALESTIERI, F. M. P.; THOMAS, G.; PIUVEZAM, M. R. Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) Leaf Extract. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 20, p. 275-279, 2001.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; ABREU, V. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MELO, C. B.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1152-1160, 2006.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; BALESTIERI, F. M. P.; ROSSI-BERGMANN, B.; PECANHA, L. M. T.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th-1 skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 1991-1997, 2004.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; ABREU, A. V.; VIEIRA, G. C.; FILHO, J. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIRES, A. L.; MARTINS, A. M.; SOUZA, H. S.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P. T.; PIUVEZAM, M. R. Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **International journal of Immunopharmacology**, v. 13, p. 148-155, 2012.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto 5813 de 22 de Junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.** 2006

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília; 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 26 de 13 de Maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.** 2014.

BRUM, L. P. **Atividade antiviral dos compostos fenólicos (Ácido ferúlico e transcinâmico) e dos flavonoides (quercetina e kaempherol) sobre o herpesvirus bovino 1, herpesvirus bovino 5 e vírus da cinomose canina.** 2006. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira.** 2008. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CAVALCANTI, A. C.; MELO, I. C. A. R.; MEDEIROS, A. F. D.; NEVES, M. V. M.; PEREIRA, A. N.; OLIVEIRA, E. J. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for

the treatment of asthma. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 527-541, 2013.

CAVALCANTI, A. C. **Otimização e padronização de metodologia para extração das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl através de planejamento experimental, quantificação de mediadores inflamatórios e obtenção de insumo ativo para formulação de fitoterápico para tratamento de asma.** 2013. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

CECHINEL, V.; YUNES, R. A. estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quimica nova**, v. 21, n. 1, p.99-105. 1998.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CERQUEIRA-LIMA, A. T.; NEVES, N. M. A.; CARVALHO, L. C. P.; COSTA, R. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M.; RUSSO, M.; BARBOZA, R.; OLIVEIRA, E. J.; MARINHO, A.; FIGUEIREDO, C. A. Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Current Drug Targets**, v. 11, p. 1458-1467, 2010.

CHEONG, M. H.; LEE, S. R.; YOO, H. S.; JEONG, J. W.; KIM, G. Y.; KIM, W. J.; JUNG, I. C.; CHOI, Y. H. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root

through inhibition of NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. **Journal Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1402-8, 2011.

CLEMER, A. J. **Padronização da técnica de RT-PCR para triagem in vitro de compostos com potencial atividade imunomodulatória em macrófagos.**

2010. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885 - 891, 2002.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.) **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 44-78. 2000.

CORTES, S. F.; ALENCAR, J. L.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 579-583, 1995.

COSTA, H. F.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MARTINS, M. A.; PIUVEZAM, M. R. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **Immunopharmacology**, v. 8, p. 519-525, 2008.

COSTA, L. M.; MOURA, N. F.; MARANGONI, C.; MENDES, C. E.; TEIXEIRA, A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 51-59, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drugs leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p. 3670–3695, 2013.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D.; ARAÚJO, J. A. P.; TÂNIA TIEKO TAKAO CATELAN, T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Brazilian Journal Rheumatology**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

DANCEY, CHRISTINE & REIDY, JOHN. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed. 2006

DIAMANT, G.; DIKSTEIN, R. Transcriptional control by NF- $\kappa$ B: elongation in focus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, n. 9, p. 937-45, 2013.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **The Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–50, 2009.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

FLOEGEL, A. KIM, D.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

FREITAS, M. R.; ALENCAR, J. L.; CUNHA, E. V. L., BARBOSA-FILHO, J. M.; GRAY, A. I. Milonine, an 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1553-1555, 1995.

FREITAS, M. R.; CORTES, S. F.; THOMAS, G.; BARBOSA, J. M. Modification of Ca<sup>+</sup> metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 332-336, 1996.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanoides e outros constituintes biotivos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407 - 411, 2009.

GLÓRIA, M. Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional entre profissionais da área da saúde em Anápolis, Goiás. **Revista do Mestrado Multidisciplinar em Sociedade**, v. 1, n. 2, p. 76-92, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOES, A. M.; CARVALHO, S.; ORÉFICE, R. L.; AVÉROUS, L.; CUSTÓDIO, T. A.; PIMENTA, J. G.; SOUZA, M DE B.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S. Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 34-40, 2012.

GOMES, R. V. R. S.; VILELA, V. L. R.; GOMES, E. N.; MAIA, A. J.; ATHAYDE, A. C. R. Análise fitoquímica de extratos botânicos utilizados no tratamento de helmintoses gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 172-177, 2011.

GONÇALVES, N. M. T.; VILA, M. M. D. C.; GERENUTTI, N.; CHAVES, D. S. A. Políticas de saúde para a fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 632-637, 2013.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 481- 504, 2000.

HEGEN, M.; KEITH, J. C.; COLLINS, M.; NICKERSON-NUTTER, C. L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Rheumatics Diseases**, v. 67, n. 11, p. 1505-1515, 2008.

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sourced. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 419-423, 2000.

JACQUES F. M. B.; BERTOLINO P. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). **Plant Systematics and Evolution**, v. 274, p. 83–97, 2008.

KIM, H. H.; KIM, D. S.; KIM, S. W.; LIM, S. H.; KIM, D. K.; SHIN, T. Y.; KIM, S. H. Inhibitory effects of Diospyros kaki in a model of allergic inflammation: Role of cAMP, calcium and nuclear factor- $\kappa$ B. **International journal of molecular medicine**, v. 32, p. 945-951, 2013.

KONDO, Y.; TAKANO, F.; HOJO, H. Inhibitory effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on nitric oxide production in activated macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, n. 11, p. 1887-1892, 1993.

KUDO, K.; HAGIWARA, S.; HASEGAWA, A.; KUSAKA, J.; KOGA, H.; NOGUCHI, T. Cepharanthine Exerts Anti-Inflammatory Effects Via NF- $\kappa$ B Inhibition in a LPS-Induced Rat Model of Systemic Inflammation. **Journal of Surgical Research**, v. 171, p. 199-204, 2011.

KVIECINSKI, M. R. **Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidroetanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae)**. 2007. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

LEITAO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A.; LIMA, V.; BRITO, G. A. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal Periodontology**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005.

LENZ, Q. F. **Determinação da atividade antiinflamatória e antioxidante de formulações semissólidas contendo nanocápsulas de nimesulida.** 2009. Mestrado em nanociências, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

LIMA, T. F. A.; ROCHA, J. D. B.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DECOTÉ-RICARDO, D.; SARAIVA, E. M.; ARRUDA, L. B., PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. Warifteine, na Alkaloid Purified from *Cissampelos sympodialis*, Inhibits Neutrophil Migration In Vitro and In Vivo. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-12. 2014.

LUQMAN S.; RIZVI, S. I.; BEER A. M., KHARE S. K.; ATUKEREN P. Efficacy of Herbal Drugs in Human Diseases and Disorders. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-2. 2014.

MAHOMOODALLY M. F., SEEBALUCK, R.; Current Practices towards the Use of Phytotherapy as Alternative Medicine in the Tropical Island of Mauritius. **Journal of Medical Research and Development**, v. 2, n. 2, p. 35-41, 2013.

MARINHO, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. A validated method for the simultaneous quantitation of bioactive alkaloid markers in the leaf ethanolic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl.: a phenological variation study. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 426-432, 2012.

MAROCO J.; BISPO, R. **Estatística aplicada às ciências sociais e humanas.** Manuais Universitários. Lisboa: CLIMEPSI Editores. 2003

MAYER, L. E.; BONA, K. S.; ABDALLA, F. H.; ALMEIDA, F. L.; POZZOBON, R. C. R.; CHARÃO, M. F.; MORETTO, M. B.; MORESCOI, R. N. Perspectivas laboratoriais na avaliação da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 91, n. 4, p.149-61, 2010.

MAZZARI A. L.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions *Frontiers. Pharmacology*, v. 5, n. 162, p. 1-12, 2014.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MIHAI, C. M.; MĂRGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; CHIRILĂ, F.; MORITZ, R. F.; SCHLÜNS, H. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 68–72, 2012.

MORENO, C. S. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121–137, 2002.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 95- 111, 2004.

NAHAR, P. P.; DRISCOLL, M. V.; LI, L.; SLITT, A. L.; SEERAM, N. P. Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. **Journal of functional foods**, v. 6, p. 126-136, 2014.

NAPOLITANO, D. R.; MINEOA, J. R.; SOUZA, M. A.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, p. 37-41, 2005.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Cytokines and Pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p.255-265, 2011.

OLIVEIRA, G. R.; SANTOS, J. T. S.; CAMPOS, A. F. P.; NUNES, T. P.; RUSSO, S. L.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. M. Prospecção tecnológica: processo de liofilização na indústria de alimentos. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 1, p.92-102. 2012.

ORTIZ, R. D. C.; KELLOGG, R. A.; VAN DER WERFF H. Molecular phylogeny of the moonseed family (Menispermaceae): Implications for morphological diversification. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 1425–1438, 2007.

PAPOTTI, G., BERTELLI, D., ROSSI, M. C., PLESSI, M. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1610–1618, 2010.

PEREIRA, C. B.; MARIN, A.; DALMORA, S. L.; NECCHI, R. M. M.; MORESCO, R. N.; MANFRON, M. P. Atividade Anti-inflamatória e Avaliação da Toxicidade do Extrato Hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 43-46, 2013.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.45-61, 2002.

PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T.; ALEXANDER, J.; THOMAS, G.. *Cissampelos sympodialis* Eichl. Leaf extract increases the production of il-10 by concanavalin-A treated BALB/c spleen cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 93-101, 1999.

PORTO, N. M.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F. Pharmacobotanical study of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae).**Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 102-107, 2008.

PORTO, N. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; OLIVEIRA, A. F. M.; AGRA, M. F. Leaf epidermal characteristics of *Cissampelos* L. (Menispermaceae) species from Northeastern Brazil. **Microscopy Research and technique**, v. 74, p. 370 – 376, 2011.

POVH, J. A.; SILVA, K. R.; SANTOS, F. B. Teor de fenóis totais e flavonóides em quatro espécies do gênero *Hyptis* Jacq. ocorrentes no cerrado stricto sensu. **Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium**, v. 3, n. 2, p. 520 – 528, 2012.

PRADO, V. M. J.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; MARTINS, L. R. R. M. Caracterização de chás de genótipos de *lippigracilis Schauer* através de perfil cromatográfico por CLAE-DAD combinado com análises quimiométricas. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1814-1818, 2012.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 803–810, 1998.

RODRIGUES, E. A. A parceria universidade-empresa privada na produção de fitoterápicos no Brasil. *Revista Fármacos e Medicamentos*, n. 37, p. 30-39, 2005.

SANDRI, SILVANA. **Amiloide sérica A: efeitos biológicos sobre células mononucleares**. 2008. Pós-graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas. Universidade de São Paulo. São Paulo.

SEMWAL, D. K.; SEMWAL, R. B.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. From arrow poison to herbal medicine – The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of *Cissampelos* (Menispermaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155; p. 1011-1028, 2014.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v.15, n. 6, p. 252–259, 2007.

SILVA, A. M. O. **Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos**. 2012. Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade de São Paulo. São Paulo.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e s. paludosum moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

SOARES, S. E.; Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição** v. 15, p. 71, 2002.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA Jr, V. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.351-355, 2007.

TAUBERT, D.; BERKELS, R.; KLAUS, W.; ROESEN, R. Nitric Oxide Formation and Corresponding Relaxation of Porcine Coronary Arteries Induced by Plant Phenols: Essential Structural Features. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 40, p. 701–713, 2002.

THAVAMANI, B. S.; MATHEW, M.; DHANABAL, S. P. Anticancer activity of *Cissampelos pareira* against dalton's lymphoma ascites bearing mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10; p. 200-206, 2014.

THOMAS, G. et al. Bronchodilatory activity of an aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in guinea-pig. **Phytomedicine**, v. 4, p. 233-238, 1997.

THOMAS, G.; ARAUJO, C. C.; AGRA, M. D.; DINIZ, M. D. F. M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. D. Preliminary studies on the hydroalcoholic extract of the root of *Cissampelos sympodialis* Eichl in guinea-pig tracheal strips and bronchoalveolar leukocytes. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 473-477, 1995.

THOMAS, G.; SELAK, M.; HENSON, P. M. Effects of an aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in human neutrophils. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 9-13, 1999.

THUKHAM-MEE W, WATTANATHORN J. Evaluation of safety and protective effect of combined extract of *Cissampelos pariera* and *Anethum graveolens* (PM52) against age-related cognitive impairment. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012; 2012.

TINCANI, A.; ANDREOLI, L.; BAZZANI, C.; BOSISO, D.; SOZZANI, S. Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 1-7, 2007.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Revista Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba Anais p. 1963-1967, 2007.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

TZENG, S. H.; KO, D. C.; KO, P. N.; TENG, C. M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research*, v. 64, p. 91-100, 1991.

VIEIRA, G. C.; DE LIMA, J. F.; DE FIGUEIREDO, R. C.; MASCARENHAS, S. R.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; PIUVEZAM, M. R. Inhaled *Cissampelos sympodialis*

Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+T Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 916-925, 2013.

VIEIRA, N. A.; TOMIOTTO, F. N.; MELO, G. P.; MANCHOPE, M. F.; LIMA, N. R.; OLIVEIRA, G. G.; WATANABE, M. A. E. Efeito anti-inflamatório do gengibre e possível via de sinalização. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 149-162, 2014.

VIGIL, S. V. G. **Estudo do efeito do Tacrolimus sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos.** 2008. Programa de Pós-graduação em farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. Q. The role of Tumor Necrosis Factor -Alpha (TNF- $\alpha$ ) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 73, n. 1, p. 117-121, 2007.

XIE, C; VEITCH, N. C; HOUGHTON, P. J.; SIMMONDS, M. S. J. Flavone C-Glycosides from *Viola yedoensis* MAKINO. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.51, n. 10, p. 1204—1207. 2003.

YOSHIZAKI, M.; FUJINO, H.; MASUYAMAA, M.; ARISAWAA, M.; MORITAA, N. A chemotaxonomic study of flavonoids in the leaves of six *Trichosanthes* species. *Phytochemistry*, v. 26, n. 9, p. 2557–2558. 1987.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.